

**ZUR ENTWICKLUNG ENZYMIMMUNOLOGISCHER
VERFAHREN FÜR DEN NACHWEIS VON
MYKOTOXINEN (AFLATOXINE, OCHRATOXIN A
UND TRICHOHECENE) IN LEBENSMITTELN**

Erwin Peter Märtlbauer

Disbui. München

1988

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Zur Entwicklung enzymimmunologischer Verfahren
für den Nachweis von Mykotoxinen
(Aflatoxine, Ochratoxin A und Trichothecene)
in Lebensmitteln

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Erwin Peter M ä r t l b a u e r

aus

Ortenburg

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. H. Zucker

Tag der Promotion: 29. Juli 1988



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089/28 44 45

Meinen Eltern
und
meiner Großmutter
Aloisia



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	3
2.1 Mykotoxine	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.1.1 Aflatoxine	3
2.1.1.2 Ochratoxine	5
2.1.1.2 Trichothecene	6
2.1.2 Metabolismus	8
2.1.2.1 Aflatoxine	8
2.1.2.1.1 Aflatoxin M ₁	9
2.1.2.1.2 Aflatoxin Q ₁	11
2.1.2.1.3 Aflatoxin P ₁	11
2.1.2.1.4 Aflatoxin B _{2α}	12
2.1.2.1.5 Aflatoxicol	12
2.1.2.1.6 Aflatoxin B ₁ -epoxid	13
2.1.2.2 Ochratoxine	13
2.1.2.3 Trichothecene	13
2.2 Immunologische Nachweisverfahren	17
2.2.1 Einführung	17
2.2.1.1 Antigen und Antikörper	17
2.2.1.2 Antigen-Antikörper-Reaktion	18
2.2.1.3 Antigennachweis unter Verwendung markierter Reagenzien	20
2.2.2 Immunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen	23
2.2.2.1 Antiseren gegen Mykotoxine	23
2.2.2.2 Markierte Mykotoxine	34

2.2.2.3	Nachweis von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln	36
2.2.2.3.1	Radioimmunologische Nachweisverfahren (RIA)	36
2.2.2.3.2	Enzymimmunologische Nachweisverfahren (EIA)	37
3	E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	42
3.1	M aterialien und Geräte	42
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	42
3.1.2	Mykotoxine	43
3.1.3	Puffer und Lösungen	43
3.1.4	Geräte	44
3.2	M ethodik	46
3.2.1	Herstellung der Immunoreagenzien	46
3.2.1.1	M ykotoxinderivate	46
3.2.1.1.1	Chromatographische Überprüfung der Mykotoxine	46
3.2.1.1.2	Reinigung und Quantifizierung der Mykotoxine	46
3.2.1.1.3	Derivatisierung	49
3.2.1.1.4	Reinigung von Mykotoxinderivaten	49
3.2.1.1.5	Ergebnisse	51
3.2.1.2	T oxin-Protein-Konjugate	53
3.2.1.2.1	Carbodilimidmethode	53
3.2.1.2.2	Gemischte Anhydridmethode	54
3.2.1.2.3	Aktive Estermethode	55
3.2.1.2.4	Reduktive Alkylierung	56
3.2.1.2.5	Diazotierung	57
3.2.1.2.6	Charakterisierung der synthetisierten Toxin-Protein-Konjugate mittels HPLC	58
3.2.1.2.7	Bestimmung der Kopplungsrate	59
3.2.1.2.8	Ergebnisse	59

3.2.1.3	Toxin-Enzym-Konjugate	68
3.2.1.3.1	Kopplung	68
3.2.1.3.2	Charakterisierung	69
3.2.1.3.3	Ergebnisse	69
3.2.1.4	Anti-Kaninchen-IgG (Schaf)	70
3.2.1.4.1	Kopplung von Kaninchen IgG an Sepharose	70
3.2.1.4.2	Affinitätschromatographie	70
3.2.1.4.3	Ergebnisse	71
3.2.1.5	Gewinnung spezifischer Antitoxinseren	72
3.2.1.5.1	Immunisierung	72
3.2.1.5.2	Immunisierungsverlauf	73
3.2.1.5.3	Aufbereitung der Antiseren	74
3.2.1.5.4	Ergebnisse	74
3.2.2	Enzymimmunologische Nachweisverfahren	80
3.2.2.1	Prinzip und Definition der verwendeten Bezeichnungen	80
3.2.2.2	Durchführung	83
3.2.2.2.1	Beschichten der Mikrotiterplatten	83
3.2.2.2.2	Spezifische Immunreaktion	83
3.2.2.2.3	Farbreaktion	83
3.2.2.3	Versuche zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit	87
3.2.2.4	Charakterisierung der Spezifität der Testsysteme	89
3.2.2.5	Ergebnisse	90
3.2.3	Computerprogramm zur Auswertung kompetitiver Enzymimmunotests	105
3.2.4	Versuche zur Anwendung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren	109
3.2.4.1	Bestimmung von Aflatoxin M ₁ in Milch und Milchpulver	109
3.2.4.2	Bestimmung von Ochratoxin A in Schweineserum	110
3.2.4.3	Ergebnisse	111

4	D i s k u s s i o n	117
4.1	Mykotoxinderivate	117
4.2	Toxin-Protein-Konjugate	119
4.3	Spezifische Antitoxinseren	121
4.4	Enzymimmunologische Nachweisverfahren	123
4.4.1	Durchführung	123
4.4.2	Empfindlichkeit	442
4.4.3	Spezifität	126
4.5	Anwendung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren	130
5	Z u s a m m e n f a s s u n g	135
6	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	139

Mykotoxine sind giftige Stoffwechselprodukte bestimmter Schimmelpilze, die pathologische Veränderungen in Mensch und Tier hervorrufen. Bis heute sind mehr als 200 dieser z. T. sehr toxischen Substanzen bekannt. Der Begriff Mykotoxin stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Worten $\mu\acute{\upsilon}\kappa\eta\varsigma$ für Pilz und $\tau\omicron\varsigma\iota\kappa\acute{o}\nu$ für Gift zusammen.

Eine Gefährdung des Menschen ist in erster Linie durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel gegeben, in einzelnen Fällen kann die Aufnahme dieser Gifte jedoch auch durch Inhalation oder Hautresorption erfolgen.

Die Kontamination von Lebensmitteln kann direkt durch das Wachstum von Toxinbildnern auf Nahrungsmitteln oder indirekt durch Übergang ("carry over") von Mykotoxinen aus Futtermitteln in den tierischen Organismus erfolgen.

Mykotoxine, für die eine indirekte Kontamination von Lebensmitteln - wie Milch, Eier oder Fleisch - nachgewiesen wurde, sind die Aflatoxine, Ochratoxin A und einige Fusarium-Toxine, insbesondere die Trichothecene. Besonders das Vorkommen des karzinogen und mutagen wirksamen Aflatoxin M_1 in der Milch und die Kontamination von Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten mit Ochratoxin A, einem Gift, das neben nephrotoxischen Eigenschaften auch teratogene, immunsuppressive und karzinogene Wirkungen zeigt, stellen ein hohes Gesundheitsrisiko für den Verbraucher dar. Die Bedeutung der hochtoxischen Trichothecene ist in dieser Hinsicht mangels Untersuchungen über den Kontaminationsgrad von Lebensmitteln noch nicht abzuschätzen. Besonders gefährdete Nahrungsmittel müssen deshalb zum Schutz des Verbrauchers regelmäßig kontrolliert werden. Da der Großteil der Mykotoxinanalytik auf physikalisch-chemischen Methoden beruht und neben großem technischen Aufwand besonders qualifiziertes Personal erfordert, kann die Untersuchung von Lebensmitteln auf Mykotoxine nur an wenigen Institutionen und in beschränktem Umfang durchgeführt werden. Die Entwicklung schneller und einfacher analytischer Methoden ist deshalb auf diesem Gebiet der Lebensmittelhygiene besonders gefordert.

Immunchemische Verfahren zur Bestimmung niedermolekularer Substanzen, wie Mykotoxine, in Lebensmitteln stellen eine relativ neue und alternative Entwicklung der analytischen Methodik dar und werden den Anforderungen nach Schnelligkeit, einfacher Handhabung und Automatisierbarkeit weitgehend gerecht. Insbesondere die Verwendung von Enzymen als "Indikatoren" oder "Marker" - vor allen anderen Möglichkeiten - könnte den immunologischen Nachweisverfahren zu breiter Anwendung verhelfen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für Aflatoxin M₁ und Ochratoxin A enzymimmunologische Nachweisverfahren zu erarbeiten, die es ermöglichen, diese Toxine spezifisch und empfindlich nachzuweisen. Daneben wurde versucht, zum Nachweis von Toxinen aus der Familie der Trichothecene Tests mit einem breitem Spektrum von Kreuzreaktionen zu erstellen, mit denen jeweils Toxingruppen bestimmt werden können. Die praktische Anwendungsmöglichkeit enzymimmunologischer Verfahren sollte an Beispielen aufgezeigt werden.

2.1 Mykotoxine

2.1.1 Allgemeines

2.1.1.1 Aflatoxine

Aflatoxine, sekundäre Stoffwechselprodukte verschiedener Stämme von *Aspergillus flavus* oder *parasiticus* (WEI et al., 1984), wurden zunächst als Aflatoxin B und G (NESBITT et al., 1962) und später als Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ (CARNAGHAN et al., 1963) beschrieben. Der endgültige Beweis für die vorgeschlagene Struktur dieser Toxine erfolgte durch die chemische Synthese von Aflatoxin B₁ (BÜCHI et al., 1967). Es zeigte sich, daß das Grundgerüst der Aflatoxine ein Difuranocoumarin ist und die Aflatoxine B₂ und G₂ Dihydroderivate der Aflatoxine B₁ und G₁ darstellen. Einige physikalische Daten über Aflatoxine sind in Tab. 1 angegeben.

Tabelle 1: Physikalische Charakteristika einiger Aflatoxine nach COLE und COX (1981)

Toxin	Molekular- gewicht	Summen- formel	$\lambda_{\max}$ bel (nm)	ϵ	Schmelzpunkt (°C)
Aflatoxin P ₁	298,0477	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	362 ^{a)}	15400	> 320
Aflatoxin B ₁	312,0633	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	362 ^{a)}	21800	268-269
Aflatoxin Q ₁	328,0582	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	366 ^{b)}	17500	266
Aflatoxin G ₁	328,0582	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	362 ^{a)}	16100	257-259
Aflatoxin M ₁	328,0582	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	357 ^{a)}	19000	299
Aflatoxin B ₂	314,0790	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	363 ^{a)}	24000	287-289
Aflatoxicol A	314,0790	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	332 ^{a)}	14100	224-226
Aflatoxicol B	314,0790	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	325 ^{a)}	14100	> 233
Aflatoxin G ₂	330,0739	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	365 ^{a)}	19300	230
Aflatoxin M ₂	330,0739	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	357 ^{a)}	20000	293
Aflatoxin B _{2α}	330,0739	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	363 ^{b)}	20400	240
Aflatoxin G _{2α}	346,0688	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	365 ^{b)}	18000	190

a) Lösungsmittel: Ethanol; b) Lösungsmittel: Methanol

Die Biosynthese der Aflatoxine (Dekaketide) erfolgt aus Acetatbausteinen über Polyhydroxyanthraquinon-Zwischenprodukte im Polyketidstoffwechsel (SINGH und HSIEH, 1977).

Die akute toxische Wirkung dieser Toxine ist von Tierart zu Tierart unterschiedlich. Die LD₅₀-Werte für verschiedene Spezies bei oraler Applikation reichen von 0,3 bis 17,9 mg Aflatoxin B₁/kg Körpergewicht (WOGAN, 1966), während die LD₅₀-Werte für verschiedene Aflatoxine nach oraler Verabreichung an Eintagsküken zwischen 0,36 und 3,1 mg/kg Körpergewicht schwanken (KIERMEIER, 1978). Bis heute ist keine Tierart bekannt, die gegen die toxische Wirkung der Aflatoxine resistent wäre (WOGAN, 1977). Sowohl bei akuter als auch subakuter Vergiftung ist hauptsächlich die Leber betroffen. Die pathologischen Veränderungen reichen von periportal oder zentrolobulärer Nekrose, Gallengangsproliferation bei manchen Tierarten bis zur Zirrhose (WOGAN, 1975). Obwohl akute Vergiftungen durch Aflatoxine in den Industrieländern kaum eine Rolle spielen dürften, kommt es in Entwicklungsländern, und hier vor allem Afrika, immer wieder zu Intoxikationen mit Todesfällen bei Mensch und Tier durch diese Schimmelpilzgifte (MANN, 1986).

Neben den toxischen Wirkungen stehen vor allem die kanzerogenen Eigenschaften der Aflatoxine im Vordergrund. Aflatoxin B₁ ist eines der stärksten bekannten Kanzerogene überhaupt und führte in allen getesteten Versuchstieren zur Bildung von Lebertumoren (WOGAN, 1977). Außerdem ist Aflatoxin B₁ eine der wenigen Verbindungen, für die neben tierexperimentellen auch brauchbare epidemiologische Daten vorliegen. Aus Untersuchungen in Uganda (ALPERT et al., 1971), Thailand (SHANK et al., 1972), Kenya (PEERS und LINSELL, 1973) und Swaziland (PEERS et al., 1976) ergibt sich ein Zusammenhang zwischen Aflatoxinaufnahme und Leberkrebsrisiko, der mit verschiedenen mathematischen Modellen beschrieben worden ist (CARLBORG, 1979; PEERS, 1980; HSIEH und RUEBNER, 1984).

2.1.1.2 Ochratoxine

Die Entdeckung toxischer Stämme von *Aspergillus ochraceus* führte 1965 zur Isolierung und Charakterisierung der Ochratoxine A, B und C (VAN DER MERVE et al., 1965). Ochratoxin A besteht aus einem Isomucarin-Anteil, der über eine α -Amidbindung an ein Molekül Phenylalanin gebunden ist. Einige physikalische Daten über Ochratoxine sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Physikalische Charakteristika einiger Ochratoxine nach COLE und COX (1981)

Toxin	Molekular- gewicht	Summen- formel	$\lambda_{\max}$ bei (nm)	ϵ	Schmelzpunkt (°C)
Ochratoxin A	403,0822	$C_{20}H_{18}O_6NCl$	333 ^{b)}	6400	169
Ochratoxin B	369,1212	$C_{20}H_{19}O_6N$	318 ^{a)}	6900	221
4-Hydroxy- ochratoxin A	419,0771	$C_{20}H_{18}O_7NCl$	334 ^{a)}	6400	216-218
Ochratoxin C	431,1135	$C_{22}H_{22}O_6NCl$	333 ^{a)}	7000	

a) Lösungsmittel: Ethanol; b) Lösungsmittel: Methanol

Im Tierversuch verursacht Ochratoxin A bei niedriger Dosierung Nephropathien. Vermutlich wird auch die "Balkan kidney disease" - eine im Balkan verbreitete Nephropathie beim Menschen - von diesem Toxin verursacht, da eine Korrelation zwischen dem Auftreten der Krankheit und dem Ochratoxin A-Gehalt der Nahrung nachgewiesen werden konnte (KROGH et al., 1977). Histopathologisch zeigt sich eine Atrophie der proximalen Nierentubuli und eine interstitielle Fibrose (KROGH, 1977). Auf molekularer Ebene scheint der Hauptangriffspunkt dieses Toxins die Phenylalanin-tRNA-Synthetase zu sein. Ochratoxin A hemmt dieses Enzym kompetitiv (Phenylalanin-Analogon), wobei bei niedrigen Konzentrationen von Ochratoxin A wahrscheinlich nur die Aminoacylierung von Phenylalanin-tRNA beeinflusst wird (RÖSCHENTHALER et al., 1981). Neben der im Vordergrund stehenden nephrotoxischen Wirkung des Ochratoxin A konnten in neueren Arbeiten immunsuppressive Eigenschaften nachgewiesen werden (HAUBECK et al., 1981). Auch teratogene Effekte werden diskutiert (MAYURA et al., 1982).

2.1.1.2 Trichothecene

Eine Vielzahl von Substanzen, die von verschiedenen *Fusarium*-, *Myrothecium*-, *Stachybotrys*-, *Cephalosporium*- und *Verticimonosporium*-Arten gebildet wird, ist in der Gruppe der Trichothecene zusammengefaßt. Als erstes Toxin aus dieser Familie wurde das Glutinosin isoliert (BRIAN und McGOWAN, 1946), das später als eine Mischung aus Verrucarin A und B identifiziert wurde (HÄRRI et al., 1962). Bis heute sind mehr als 46 dieser Sesquiterpenoide bekannt, denen allen die 12,13-spiro-Epoxidgruppe gemeinsam ist (SNYDER, 1986).

Öblicherweise werden die 12,13-Epoxytrichothecene in vier Gruppen (A, B, C und D) eingeteilt (UENO, 1977b). Vertreter der Gruppe A, wie T-2 Toxin oder Diacetoxyscirpenol, unterscheiden sich durch die Zahl der Hydroxyl- bzw. Acetylreste an C₃, C₄, C₇, C₈ und C₁₅. Die Gruppe B hat an C₈ eine Carbonylfunktion, während in Gruppe C ein "makrozyklischer" Ring zwischen C₄ und C₁₅ gespannt ist. Crotoclin, das eine zweite Epoxidgruppe an C₇ und C₈ besitzt, bildet die Gruppe D. Einige physikalische Daten über die für die vorliegende Arbeit relevanten Trichothecene sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Die Trichothecene zählen mit zu den am stärksten toxischen nichtstickstoffhaltigen natürlich vorkommenden Substanzen. Die LD₅₀-Werte für Mäuse bei Intraperitonealer Applikation liegen zwischen 0,5 und 145 mg/kg Körpergewicht (SNYDER, 1986), wobei unter den Vertretern der Gruppe A die Toxizität der mehrfach acetylierten Toxine am höchsten ist. Unter den makrozyklischen Trichothecen besitzten die Roridine eine zentrale Stellung, da sie eine Zwischenstufe in der Biosynthese der meisten anderen makrozyklischen Toxine darstellen (JARVIS et al., 1982). Roridin A, eine zyto-statisch wirksame Verbindung, wurde aus Kulturen von *Myrothecium verrucaria* und *Myrothecium roridum* isoliert (HÄRRI et al., 1962) und auch in den Pflanzen *Baccharis megapotamica* (JARVIS et al., 1981) und *Baccharis coridifolia* (BUSAM und HABERMEHL, 1982; HABERMEHL et al., 1985) gefunden. Die Aufnahme und Speicherung makrozyklischer Trichothecene durch diese Pflanzen führte in Brasilien und Argentinien zu Vergiftungen bei Nutztieren (BUSAM und HABERMEHL, 1982; HABERMEHL et al., 1985). Da auch andere Gesundheitsstörungen bei Tieren auf diese Toxingruppe zurückgeführt werden konnten, stellen diese Gifte ein ernstes Problem für die Tierproduktion dar (EPPLY, 1977; HINTIKKA, 1977).

Tabelle 3: Physikalische Charakteristika einiger Trichothecene nach COLE und COX (1981)

Toxin	Molekular- gewicht	Summen- formel	$\lambda_{\max}$ bei (nm)	ε	Schmelzpunkt (°C)
<u>Gruppe A</u>					
Verrucarol	266,1517	$C_{15}H_{22}O_4$	195 ^{a)}	7900	148-159
Scirpentriol	282,1461	$C_{15}H_{22}O_5$	< 200		193
T-2 tetraol	298,1410	$C_{15}H_{22}O_6$	< 200		k.A. ^{c)}
Monoacetoxy- scirpenol	324,1566	$C_{17}H_{24}O_6$	< 200		172-173
Diacetoxy- scirpenol	366,1671	$C_{19}H_{26}O_7$	< 200		162-164
Neosolaniol	382,1620	$C_{19}H_{26}O_8$	< 200		171-172
HT-2 Toxin	424,2096	$C_{22}H_{32}O_8$	< 200		k.A.
T-2 Toxin	466,2193	$C_{24}H_{34}O_9$	< 200		151-152
4,15-Diacetyl- verrucarol	350,1722	$C_{19}H_{26}O_6$	< 200		147-148
Acetyl T-2 Toxin	508,2298	$C_{26}H_{36}O_{10}$	< 200		k.A.
<u>Gruppe B</u>					
Deoxynivalenol	296,1254	$C_{15}H_{20}O_6$	218 ^{a)}	4500	151-153
Nivalenol	312,1203	$C_{15}H_{20}O_7$	218 ^{b)}	7500	222-223
Fusarenon X	354,1308	$C_{17}H_{22}O_8$	220 ^{b)}	6500	181-182
<u>Gruppe C</u>					
Satratoxin G	544,1935	$C_{28}H_{32}O_{11}$	256 ^{b)}	6500	167-170
Satratoxin H	528,2349	$C_{29}H_{36}O_9$	255 ^{b)}	10400	162-166
Roridin A	532,2413	$C_{29}H_{40}O_9$	263 ^{a)}	18600	198-204
Baccharin	562,2413	$C_{20}H_{38}O_{11}$	259 ^{a)}	18700	200-230
Verrucaric A	502,2201	$C_{27}H_{34}O_9$	260 ^{a)}	17700	> 360

a) Lösungsmittel: Ethanol; b) Lösungsmittel: Methanol; c) keine Angaben

Mit einer Gefährdung der menschlichen Gesundheit muß ebenfalls gerechnet werden, wie der Bericht von CROFT et al. (1986) zeigt. Neben der akuten toxischen Wirkung zeigen die Trichothecene antibiotische, antimykotische, antivirale, insektizide, cytotoxische und cytostatische Eigenschaften (BAMBURG und STRONG, 1971). Auf zellulärer Ebene liegt diesen Wirkungen eine Hemmung der Protein- und DNA-Synthese zugrunde (UENO, 1977a).

2.1.2 Metabolismus

2.1.2.1 Aflatoxine

Der größte Teil des resorbierten Aflatoxin B₁ wird in der Leber metabolisiert und zwar hauptsächlich durch ein mikrosomales, membrangebundenes und NADPH-abhängiges Enzymsystem (CAMPBELL, 1977). Tierartspezifische Unterschiede im resultierenden Metabolitenmuster, die z.T. mit der Empfindlichkeit der entsprechenden Spezies gegenüber dem Toxin korrelieren (PATTERSON, 1973), zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 4: Speziesunterschiede bei der Metabolisierung von Aflatoxin B₁

Spezies	Zeit für die Metabolisierung einer LD ₅₀	Aflatoxin-Metaboliten (%)					
		Afla- toxicol	Q ₁	M ₁	B _{2α}	P ₁	Protein- gebunden
Kaninchen ^{a)}	39,6 s	+	k.A.	+	+		k.A.
Affe ^{b)}	6,4 min	2,0	10,1	4,0	3,3	-	12,0
Meerschw. ^{a)}	11,8 min	-	k.A.	+	+	?	k.A.
Hamster ^{a)}	k.A.	0,6	8,3	4,0	0,4	-	5,0
Ente ^{b)}	k.A.	6,0	1,6	1,1	10,5	-	4,4
Mensch ^{b)}	13,3 min	0,7	8,5	3,8	0,7	-	6,1
Maus ^{a)b)}	1,57 h	1,3	1,7	1,8	0,4	2,8	1,3
Schwein ^{a)}	2,50 h	-	k.A.	+	-	-	k.A.
Schar ^{a)}	4,26 h	-	k.A.	+	-	-	k.A.
Ratte ^{a)b)}	0,8-2,6 d	1,5	1,3	0,9	0,2	+	2,5

a) Angaben nach PATTERSON (1973) b) Angaben nach HSIEH et al. (1977);
(+ = nachgewiesen; ? = fraglich; - = nicht nachgewiesen; k.A.= keine Angaben)

Eine ausführliche Zusammenfassung mit über 120 Literaturzitaten zum Metabolismus von Aflatoxin B₁ geben CAMPBELL und HAYES (1976), so daß im Folgenden die in Abb. 1 dargestellten Hauptmetaboliten nur kurz charakterisiert werden.

2.1.2.1.1 Aflatoxin M₁

Bald nach der teilweisen chemischen Charakterisierung des Aflatoxin B₁ konnte in der Milch von Kühen, die aflatoxinhaltiges Erdnußmehl aufgenommen hatten, ein "toxischer Faktor" festgestellt werden (ALLCROFT und CARNAGHAN, 1963), der später "milk toxin" (de IONGH et al., 1964) und schließlich Aflatoxin M (ALLCROFT et al., 1966) genannt wurde. Im gleichen Jahr isolierten und charakterisierten HOLZAPFEL et al. (1966) aus Schafurin einen Metaboliten, der das 4-Hydroxyderivat von Aflatoxin B₁ darstellte, und ein Jahr später konnten MASRI et al. (1967) beweisen, daß dieser mit dem in Kuhmilch gefundenen Metaboliten identisch war.

Die Toxizität des Aflatoxin M₁ ist nur geringfügig schwächer als die von Aflatoxin B₁ (PURCHASE, 1967), die Karzinogenität dagegen ist deutlich reduziert (WOGAN und PAGLIALUNGA, 1974, CANTON et al. 1975).

Über den Metabolismus von Aflatoxin M₁ selbst gibt es kaum Untersuchungen, da es lange Zeit nicht gelang, ausreichende Mengen radioaktiv markierten Toxins bereitzustellen. In neueren in vitro Studien konnten RICE und HSIEH (1982) jedoch nachweisen, daß Aflatoxin M₁ kaum weiter verstoffwechselt wird und sich nur in sehr geringem Umfang an Makromoleküle bindet, so daß dieser Aflatoxin B₁-Metabolit wohl keine Rolle als Zwischenstufe bei der Aktivierung von Aflatoxin B₁ zum eigentlichen Karzinogen spielt, sondern eher als polares (hydroxyliertes) Detoxifizierungsprodukt anzusehen ist. Eine Anreicherung von Aflatoxin M₁ im Organismus wurde bis jetzt nicht beschrieben, vielmehr wird dieses Toxin schnell über die Niere ausgeschieden. Bei allen untersuchten Säugetierarten konnte außerdem ein Übergang in die Milch nachgewiesen werden, in der Aflatoxin M₁ den Hauptmetaboliten von Aflatoxin B₁ darstellt, während andere Derivate und Konjugate nur eine untergeordnete Rolle spielen (GOTO und HSIEH, 1985). Der Zusammenhang zwischen Aflatoxin B₁-Aufnahme und Aflatoxin M₁-Ausscheidung in die Milch wurde mit mehreren mathematischen Modellen be-

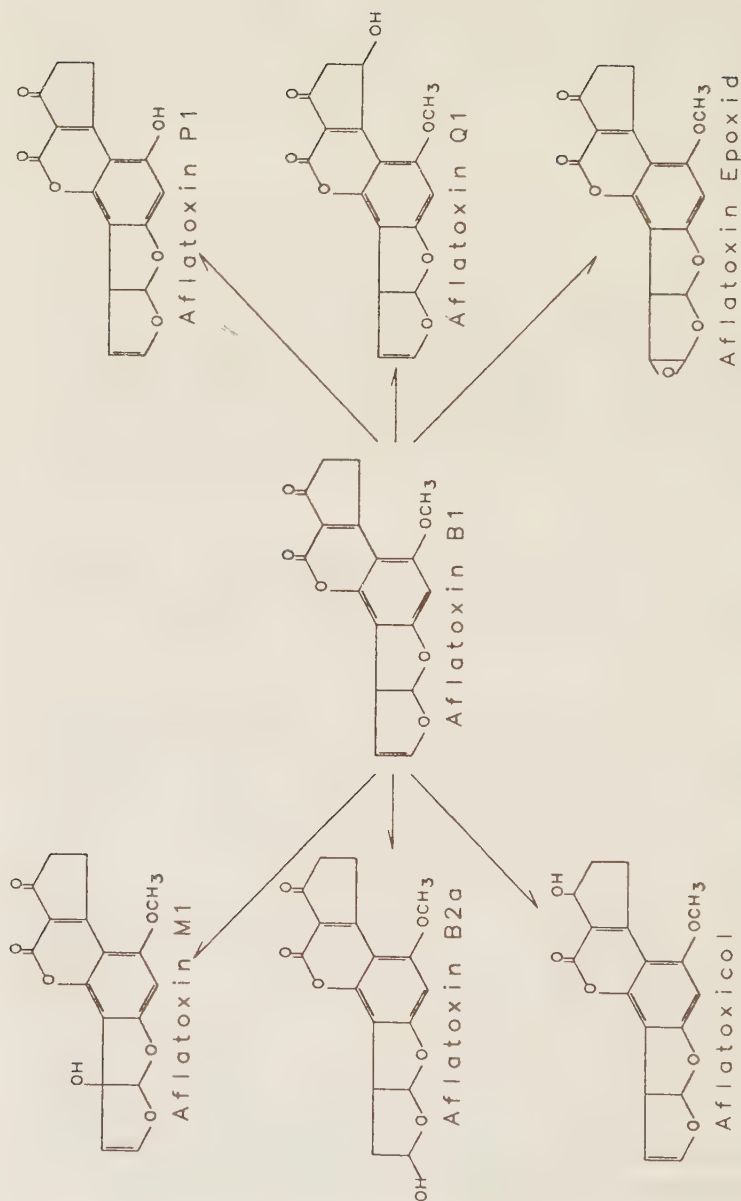


Abbildung 1: Aflatoxin B₁ und seine Metabolite nach CAMPBELL und HAYES (1976)

schrieben. So geben SIEBER und BLANC (1978) basierend auf Literaturdaten einen linearen Zusammenhang, bei Aufnahme von Aflatoxin B₁ im mg/Tag-Bereich, an, während ein jüngst publizierter Fütterungsversuch mit natürlich kontaminiertem Material und niedrigen, praktisch relevanten Toxinkonzentrationen auf eine exponentielle Beziehung hinweist (MUNKSGAARD et al., 1987). Bei einer täglichen Aufnahme von 60 µg Aflatoxin B₁ berechnen diese Autoren einen zu erwartenden Aflatoxin M₁-Gehalt in der Milch von ca. 38 ng/kg nach folgender Formel:

$$\text{ng Aflatoxin M}_1/\text{kg Milch} = 1,24 \times (\text{g Aflatoxin B}_1/\text{Tag})^{0,834}$$

Bei einer durchschnittlichen Milchleistung entspricht dies etwa 1,3 % der aufgenommenen Menge an Aflatoxin B₁. Die Angaben anderer Autoren liegen etwas höher und reichen von 1,6 - 2,2 % (PATTERSON et al., 1980; PRICE et al., 1985; FROBISH et al., 1986). In diesem Zusammenhang soll noch erwähnt werden, daß nach Induktion mikrosomaler Enzymsysteme durch z.B. polychlorierte Biphenyle ein erhöhter Umbau von Aflatoxin B₁ in Aflatoxin M₁ nachgewiesen wurde (HALVORSEN et al., 1985).

2.1.2.1.2 Aflatoxin Q₁

Ebenfalls ein hydroxiliertes Derivat von Aflatoxin B₁ stellt Aflatoxin Q₁ dar. Der an C₅ hydroxilierte Metabolit (Abb. 1) scheint in besonders hohem Maße in Leberzellmikrosomen von Mensch und Affe gebildet zu werden (Tab.4). Aflatoxin Q₁ zeigt im Hühnerembryotest nur geringe Toxizität und ist praktisch nicht mutagen wirksam (HSIEH et al., 1974), sodaß dieser Metabolit ähnlich wie das Aflatoxin M₁ als polares Detoxifizierungsprodukt des Organismus anzusehen ist (HSIEH et al., 1977).

2.1.2.1.3 Aflatoxin P₁

Aflatoxin P₁, ein demethyliertes Derivat von Aflatoxin B₁ (Abb. 1), konnte als Stoffwechselprodukt von Ratte, Maus (DAHMS und GURTOO, 1976) und Rhesusaffe (DALEZIOS et al., 1973) nachgewiesen werden. Nach oraler Applikation erscheinen bei Rhesusaffen bis zu 5 % der aufgenommenen Menge an Aflatoxin B₁ als Aflatoxin P₁ in konjugierter Form (Glucuronide und Sulfonide) im Urin (DALEZIOS et al., 1973). Die Toxizität ist deutlich geringer

als die von Aflatoxin B₁ (BÜCHI et al., 1973), so daß Aflatoxin P₁ wie die anderen Hydroxyderivate vermutlich ein polares Ausscheidungsprodukt darstellt (PATTERSON, 1973).

2.1.2.1.4 Aflatoxin B_{2α}

Das Hemiacetal von Aflatoxin B₁ (POHLAND et al., 1968) liegt bei pH-Werten über 7,4 hauptsächlich als resonanzstabilisiertes Phenolation vor und kann mit freien Aminogruppen Schiff'sche Basen bilden (ASHOOR und CHU, 1975). Dies erklärt einerseits die geringe Toxizität dieses Metaboliten bei der oralen Verabreichung, auf der anderen Seite kann es jedoch - wie PATTERSON (1973) vermutet - in der Zelle zur Hemmung von Enzymen des Intermediärstoffwechsels und damit zum Zelltod durch diesen aktiven Metaboliten kommen. Aflatoxin B_{2α} könnte somit bei der akuten toxischen Wirkung des Aflatoxin B₁ eine entscheidende Rolle zukommen, vor allem bei Spezies, die in der Lage sind Aflatoxin B₁ schnell zu Aflatoxin B_{2α} umzusetzen (PATTERSON, 1973; HSIEH et al., 1977).

2.1.2.1.5 Aflatoxicol

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Metaboliten wird das Aflatoxicol nicht von einem mikrosomalen sondern einem cytoplasmalen, NADPH₂-abhängigen Enzymsystem durch Reduktion der Carbonylgruppe des Cyclopentanonringes gebildet (PATTERSON und ROBERTS, 1971). Da die enzymatische Umsetzung reversibel ist, stellt das Aflatoxicol möglicherweise ein Toxinreservoir in der Zelle dar (PATTERSON, 1973). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß zumindest bei einigen Tierarten ein Teil des Aflatoxicols - an C₁₄ hydroxiliert - zu Aflatoxicol M₁ umgesetzt (SALHAB et al., 1977; EISELE et al., 1982) und wahrscheinlich in konjugierter Form über die Niere ausgeschieden wird (LOVELAND et al., 1983). Die Toxizität des Aflatoxicols ist für Entenküken etwa 18 mal geringer als die von Aflatoxin B₁ (DETROY und HESSELTINE, 1968), im Amestest (AMES et al., 1973) zeigt diese Verbindung jedoch die größte mutagene Wirksamkeit aller bisher isolierten Aflatoxin B₁-Metaboliten (WONG und HSIEH, 1976).

2.1.2.1.6 Aflatoxin B₁-epoxid

Das Aflatoxin B₁-2,3-epoxid scheint den hochreaktiven Metaboliten (SWENSON et al., 1977) darzustellen, über den sowohl in vitro als auch in vivo das DNA-addukt 2,3-dihydro-2-(N7-guanyl)-3-hydroxy Aflatoxin B₁ (ESSIGMANN et al., 1977; LIN et al., 1977; MARTIN und GARNER, 1977), das unter physiologischen Bedingungen vermutlich als 2,3-dihydro-2-(N5-formyl-2', 5', 6'-triamino-4-oxo-N5-pyrimidyl)-3-hydroxy Aflatoxin B₁ vorliegt (WANG und CERUTTI, 1979), entsteht. Die Bildung von DNA-Toxin-Komplexen zusammen mit der Hemmung von Enzymen der Reparaturmechanismen, wie der Säuredeoxyribonuklease, durch z.B. Aflatoxin B_{2α} dürfte zumindest teilweise für die toxische und kanzerogene Wirksamkeit dieser Toxingruppe verantwortlich sein (LÖTTER und SCHABORT, 1983).

2.1.2.2 Ochratoxine

Als Abbauprodukte von Ochratoxin A wurden (4R)- und (4S)-4-Hydroxy-Ochratoxin A beschrieben (STØRMER et al., 1981). Von diesen in vitro gefundenen Metaboliten konnte in vivo bis heute allerdings nur das (4R)-4-Hydroxy-Ochratoxin A neben dem Ochratoxin α nachgewiesen werden (Abb. 2) (STØREN et al., 1982). Eine Übersicht zu Bedeutung und Vorkommen von Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette geben BAUER und GAREIS (1987).

2.1.2.3 Trichothecene

Zum Metabolismus von Trichothecenen liegen fast ausschließlich Daten über T-2 Toxin und dessen Metabolite vor. Nach in vitro Versuchen mit Leberhomogenaten von Versuchstieren schlugen YOSHIZAWA et al. (1984) die in Abb. 3 dargestellten Ab- und Umbauwege vor. Bestätigt wurde dieser "metabolic pathway" durch die Arbeiten von KABILKA (1985) und KNUPP et al. (1986). Die meisten der in diesen Studien identifizierten Metabolite konnten auch in vivo nachgewiesen werden, neben einer Vielzahl zusätzlicher zum Teil noch nicht charakterisierter Abbauprodukte (YOSHIZAWA et al., 1980; YOSHIZAWA et al., 1981; CORLEY et al., 1985; VISCONTI und MIROCHA, 1985; CORLEY et al., 1986).

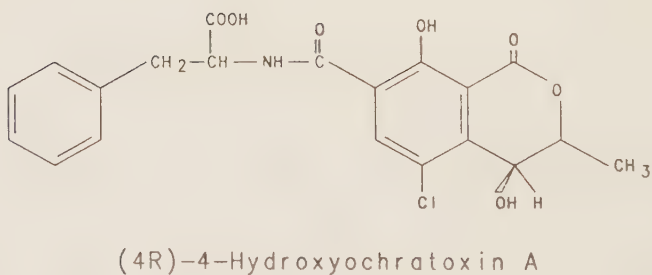
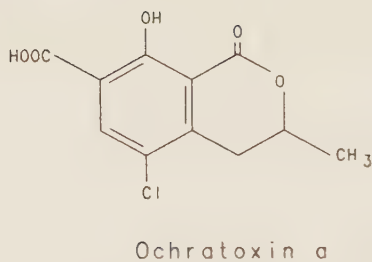
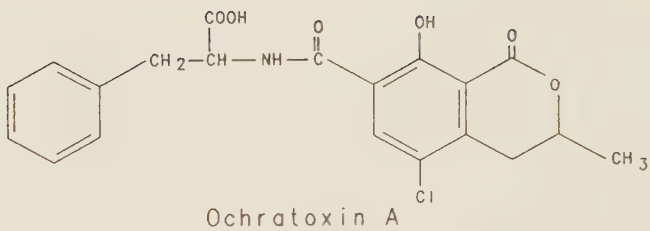


Abbildung 2: Ochratoxin A und in vivo nachgewiesene Metabolite

Neben den in Abb. 3 dargestellten Abbauwegen, wie Deacetylierung, Acetylierung und Hydroxylierung scheint auch die Deepoxidierung - vor allem im Gastrointestinaltrakt - eine wichtige Rolle zu spielen (CHATTERJEE et al., 1986; COTE et al., 1986).

Zur Bedeutung und Toxizität der einzelnen Metabolite liegen kaum Angaben vor. LD₅₀-Dosen (in mg/kg Körpergewicht bei Eintagsküken) wurden für HT-2 Toxin (7,22), Neosolaniol (24,87), T-2 tetraol (33,79) und 8-Acetylneosolaniol (3,22) beschrieben (CHI et al., 1978). Der Wert für T-2 Toxin in der gleichen Versuchsreihe betrug 4,97. Über die Rolle und relative Toxizität der jüngst identifizierten Metabolite wie z. B. der an C₃' hydroxilierten oder der deepoxidierten T-2 Derivate ist bis jetzt sehr wenig bekannt. Erste Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß zumindest die deepoxidierten Analoga nur noch geringe bzw. keine toxische Wirkung mehr zeigen (SWANSON et al., 1987).

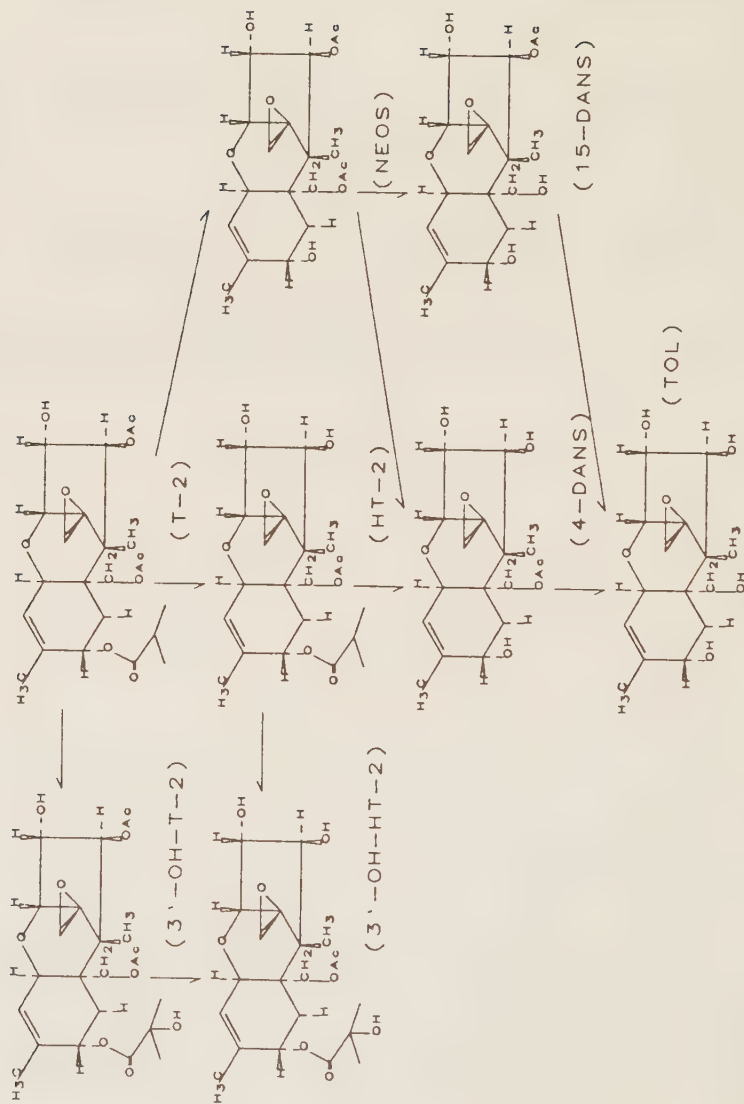


Abbildung 3: T-2 Toxin und seine Metabolite nach YOSHIZAWA et al. (1984)

2.2 Immunologische Nachweisverfahren

2.2.1 Einführung

2.2.1.1 Antigen und Antikörper

Immunologische Nachweisverfahren basieren auf der Fähigkeit von Antikörpern, dreidimensionale Strukturen zu "erkennen", und spielen seit langem eine Rolle als diagnostische "Reagenzien" vor allem in der biomedizinischen Forschung und der klinischen Diagnostik (FALKENBERG et al., 1984).

Die Bildung von Antikörpern gegen körperfremde Strukturen ist einer der vielfältigen Abwehrmechanismen, der in den meisten Vertebraten nachgewiesen werden konnte (STANWORTH und TURNER, 1979). Moleküle, die diese spezifische De-novo-Immunantwort auslösen, werden als "Immunogene" bezeichnet und müssen neben körperfremden Strukturen eine bestimmte Größe (In der Regel > 5000 Dalton) aufweisen (HUMPHREY und WHITE, 1972). Dagegen werden als "Haptene" Substanzen bezeichnet, die per se keine Immunantwort auslösen, wohl aber mit bereits vorgebildeten Antikörpern reagieren können (LANDSTEINER, 1946). Die Bildung von Antikörpern gegen Haptene kann durch die Applikation künstlicher Immunogene, d.h. an einen Träger ausreichender Größe (in der Regel ein körperfremdes Protein) gebundene Haptene, induziert werden. Viele grundlegende Erkenntnisse über die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion und die Struktur der Immunglobuline wurden durch Experimente mit Haptenen gewonnen (ROITT, 1984). Der bereits erwähnte Ausdruck "Antigen" wird in der Literatur unterschiedlich definiert und im Folgenden synonym für Immunogen und Hapten gebraucht, solange eine Differenzierung für den Zusammenhang ohne Belang ist. Eine Übersicht und Einführung in die theoretischen Aspekte der Immunglobulinbildung gibt ROITT (1984), die praktische Durchführung besprechen HURN und CHANTLER (1980).

Biochemisch stellen Antikörper eine Gruppe mehrkettiger Glykoproteine dar, deren Zusammensetzung allgemein mit der Formel $(HL)_2n$ beschrieben werden kann, wobei H und L die schweren (heavy; 50-77 000 Dalton) bzw. leichten (light; 25 000 Dalton) Polypeptidketten darstellen, die über Disulfidbrücken, aber auch über nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Jede leichte bzw. schwere Kette besitzt an ihrem N-terminalen Ende eine variable (V-) Region von etwa 105-115 Aminosäureresten, in der eine 'hypervariable'

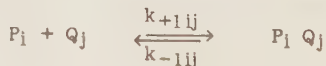
Region von 10 oder mehr Aminosäuren liegt, die als die eigentliche Antigenbindungsstelle angesehen wird. Der Rest der Kette zeigt dagegen eine relativ konstante (constant) Zusammensetzung und wird als C-Region bezeichnet; sie ist in allen Immunglobulinen der gleichen Klasse, Subklasse und des gleichen Allotyps identisch (STANWORTH und TURNER, 1973; RAWN, 1983; ROITT, 1984). Hinsichtlich weiterer Einzelheiten betreffend der Primärstruktur und Einteilung der Immunglobuline sei auf die drei zuletzt zitierten Autoren verwiesen.

Entscheidend für die Fähigkeit, dreidimensionale Strukturen zu erkennen, ist die Tertiärstruktur der Immunglobuline. Besonders auffällig sind hierbei β -gefaltete Blattstrukturen, die durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden, die sog. Domänen. Die V-Region der leichten (V_L) und der schweren (V_H) Kette sind solche Domänen, die zusammen die dreidimensionale Struktur bilden, in der die Antigenbindungsstelle liegt, die durch räumliche Annäherung von Peptidschleifen mit den hypervariablen Regionen der leichten und schweren Ketten entsteht. Analog zum antigenbindenden Teil (Fab-Teil) eines Immunglobulins besteht das übrige Molekül (Fc-Teil) aus weiteren Domänen, die für verschiedene biologische Eigenschaften der einzelnen Immunglobulinklassen verantwortlich sind (ROITT, 1984).

2.2.1.2 Antigen-Antikörper-Reaktion

Nach KUSS (1984) werden als immunologische Reaktionen "die reversiblen Assoziationsreaktionen bezeichnet, die zwischen hydratisierten Immunglobulinen und ihren ebenfalls hydratisierten Antigenen ablaufen und die zur Bildung von Immunkomplexen führen". Die Bindungskräfte, die dabei eine Rolle spielen, sind schwache Wechselwirkungen, wie Coulomb- und Van der Waals'sche Kräfte sowie Wasserstoffbrücken- und hydrophobe Bindungen (ROITT, 1984).

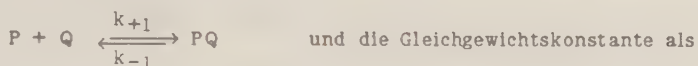
Die allgemeine Reaktionsgleichung (KUSS, 1984) für Antigene mit den Bindungsplätzen P_i ($i = 1, 2, \dots, m$) und Immunglobuline mit den Bindungsplätzen Q_j ($j = 1, 2, \dots, n$) lautet:



Die Assoziationskonstante k_{+1ij} und die Dissoziationskonstante k_{-1ij} ergeben nach dem Massenwirkungsgesetz die Gleichgewichtskonstante (K_{ij}):

$$\frac{[P_i Q_j]}{[P_i] [Q_j]} = \frac{k_{+1ij}}{k_{-1ij}} = K_{ij}$$

Unter der Annahme einer homogenen Bindungsklasse von Antikörpern (mit einer einzigen Antigenbindungsstelle) und eines monovalenten Antigens kann die Reaktionsgleichung vereinfacht als



$$\frac{[PQ]}{[P] [Q]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K \quad \text{geschrieben werden (PINCKARD, 1979).}$$

Dieser Gleichgewichtszustand der Antigen-Antikörper-Reaktion stellt sich nach den kinetischen Studien von PECHT und LANCET (1977) in zwei Schritten ein:



wobei hier $P \rightleftharpoons Q$ einen "Annäherungs"- (encounter) Komplex darstellt, in dem P und Q eine gemeinsame Solvationshülle ausbilden, aber noch keine elementaren Wechselwirkungen eingehen. Erst im zweiten Schritt, dem eigentlichen Bindungsschritt, entsteht der endgültige nicht-kovalente Komplex (PQ). Dieser Zwei-Schritt-Bindungsmechanismus, der wahrscheinlich allen in Lösungen stattfindenden Assoziationsreaktionen zugrunde liegt (EIGEN, 1974), ermöglicht die Unterscheidung zwischen dem "zufälligen", durch Diffusions- und geometrische Eigenschaften der reagierenden Moleküle bestimmten Teil der immunologischen Reaktion und dem eigentlichen spezifischen, auf chemischen und strukturellen Eigenschaften beruhenden Bindungsschritt (PECHT und LANCET, 1977).

2.2.1.3 Antigennachweis unter Verwendung markierter Reagenzien

Immunologische Verfahren zum Nachweis von Antigenen unter Verwendung markierter Reagenzien basieren auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion und können nach JACKSON und EKINS (1986) in zwei grundlegend verschiedene Systeme eingeteilt werden. Die Antigenkonzentration kann danach einerseits durch Bestimmung der Anzahl der reagierenden Antigenmoleküle (P) oder andererseits durch Messung der an der Reaktion beteiligten Antikörpermoleküle (Q) berechnet werden. In der praktischen Durchführung erfordern diese Methoden entweder markiertes Antigen (P*) oder markierten Antikörper (Q*) als meßbare Größen.

Das erste Prinzip gilt für immunologischer Verfahren, bei denen Antigen und markiertes Antigen um eine begrenzte Anzahl spezifischer Antikörpermoleküle konkurrieren, und kann schematisch wie folgt formuliert werden:

$$P + P^* + Q = (PQ + PQ^*) + (P + P^*)$$

Die Meßgröße bei diesen kompetitiven Verfahren ist entweder das im Antigen-Antikörper-Komplex gebundene markierte Antigen (PQ*) oder das freie markierte Antigen (P*).

Das zweite Prinzip gilt für immunologische Verfahren, bei denen eine begrenzte Anzahl von Antigenmolekülen von spezifischen Antikörpermolekülen, die teilweise markiert sind, gebunden werden:

$$P + Q + Q^* = (QPQ^*) + (Q + Q^*)$$

Die Meßgröße bei diesen nicht-kompetitiven Verfahren ist entweder der im Antigen-Antikörper-Komplex gebundene markierte Antikörper (QPQ*) oder der freie markierte Antikörper (Q*).

Beide Systeme können in Abhängigkeit von verschiedenen Charakteristika (wie Reihenfolge der Reagenzienzugabe, Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Reagenzien, Messung der gebundenen oder freien Fraktion des markierten Reagenzes usw.) weiter unterteilt werden. Da die Begriffsdefinitionen dieser Untergruppen von den einzelnen Autoren unterschiedlich

gebraucht werden, sei hier auf die Arbeiten von WISDOM (1976), O'SULLIVAN et al. (1979), ENGVALL (1980), SCHALL (1980), NGO und LENHOFF (1981), DWENGER (1984), OELLERICH (1984) und WOOD (1984) verwiesen. Im Folgenden soll nur auf die für die vorliegende Arbeit relevanten, die kompetitiven immunologischen Nachweisverfahren, näher eingegangen werden.

Der mathematische Zusammenhang zwischen Abnahme des gebundenen markierten Antigens (P_b^*) und Zunahme der Konzentration des unmarkierten Antigens (P) basiert auf dem Massenwirkungsgesetz (s. 2.2.1.2) und lautet nach HALFMAN und SCHNEIDER (1981):

$$P_b^* = \frac{P^*}{2(P + P^*)} \left\{ P + P^* + Q + K - \sqrt{(P + P^* + Q + K)^2 - 4Q(P + P^*)} \right\} \quad (1)$$

wobei P^* die Gesamtkonzentration des markierten Antigens, Q die Gesamtkonzentration der Antikörperbindungsstellen und K die Dissoziationskonstante der Reaktion darstellt und für P und P^* gleich ist. Desweiteren wird vorausgesetzt, daß die Antikörperbindungsstellen homogen sind, die Trennung von gebundenem und nicht gebundenem Antigen vollständig ist und die Messung des gebundenen markierten Antigens im Gleichgewichtszustand der Reaktion erfolgt. Optimale Testbedingungen, die es erlauben, die kleinstmögliche Antigenkonzentration nachzuweisen, sind nach HALFMAN und SCHNEIDER (1981) für $Q = 0.5 K$ und $P^* \ll 0.5 K$ erreicht. Die theoretisch größtmögliche Empfindlichkeit eines optimierten Testes unter Berücksichtigung der experimentellen Fehlerquellen und der spezifischen Aktivität des markierten Antigens wird von JACKSON und EKINS (1986) mit:

$$(\sigma_P)_0 = \left\{ Q R_0 + \frac{1}{R_0 K} \right\} \times \sqrt{\frac{R_0 + 1}{R_0 P^* S V T} (1 + \sqrt{R_0})^2 + z^2} \quad (2)$$

angegeben, wobei $(\sigma_P)_0$ die Empfindlichkeit (Standardabweichung bei der Messung einer Antigenkonzentration = 0), R_0 die Signalintensität bei Messung einer Antigenkonzentration = 0, S die spezifische Aktivität des markierten Antigens, V das Volumen, T die Meßzeit und z den relativen Meßfehler darstellt.

Für ein markiertes Antigen mit unbegrenzter spezifischer Aktivität ($S \rightarrow \infty$) kann die Gleichung vereinfacht als

$$(\sigma p)_0 = \frac{VK_{R0}}{K} \quad (3)$$

geschrieben werden, wobei VK_{R0} den Variationskoeffizienten bei wiederholter Messung einer Antigenkonzentration $= 0$ darstellt. Zur Verdeutlichung ist dieser Zusammenhang zwischen Testempfindlichkeit, spezifischer Aktivität des markierten Antigens und der Affinitätskonstanten (Gleichgewichtskonstanten) K der Antigen-Antikörperreaktion für ein mit ^{125}J markiertes Antigen im Vergleich zu der aus Gleichung 3 abgeleiteten theoretischen Kurve dargestellt.

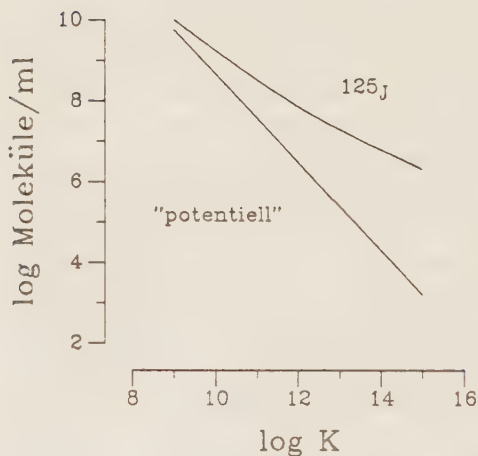


Abbildung 4: Empfindlichkeit eines kompetitiven Immunotests in Abhängigkeit von der Affinität der Antikörper. Die Kurve für ^{125}J als Marker wurde nach Gleichung 2 berechnet, die "potentiell" mögliche Kurve nach Gleichung 3.

Prinzipiell gelten die obigen Ausführungen sowohl für radioimmunologische als auch für enzymimmunologische Verfahren. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Assoziationsgeschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion von den Diffusionskoeffizienten der reagierenden Moleküle und damit von deren Molekulargewicht abhängt (PECHT und LANCET, 1977). Das Gleichgewicht einer Immunreaktion wird somit aufgrund des großen Molekulargewichtsunterschiedes immer schneller mit tritiummarkierten als mit enzymmarkierten "Markern" zu erreichen sein (MEYER, 1986).

2.2.2 Immunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen

2.2.2.1 Antiseren gegen Mykotoxine

Neben der seit langem etablierten Anwendung von immunchemischen Verfahren in der klinischen Diagnostik spielen diese Methoden seit einiger Zeit auch bei der Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln auf Arzneimittelrückstände, Pestizide, polychlorierte Biphenyle und Mykotoxine eine immer größere Rolle (MORGAN, 1985; NEWSOME, 1986; SCHWALBE-FEHL, 1986). Alle diese Stoffe einschließlich der Mykotoxine sind nach den in 2.2.1 definierten Begriffen als Haptene zu bezeichnen. Die Gewinnung von Antiseren gegen Mykotoxine setzt somit die Kopplung an ein Makromolekül, d.h. die künstliche Synthese des Immunogens, voraus. Da Mykotoxine mit wenigen Ausnahmen, wie etwa Ochratoxin A, Patulin oder Penicillinsäure keine reaktive Gruppe besitzen, die direkt zur Kopplung an ein Trägerprotein benutzt werden kann, müssen die Toxine zunächst derivatisiert werden (CHU, 1984). Bei der Umsetzungsreaktion wird meist eine Carboxylfunktion als reaktive Gruppe in das Molekül eingeführt (CHU, 1985), die dann für die Kopplungsreaktion zur Verfügung steht.

Die Kopplungsmethoden wurden ursprünglich für die Peptidsynthese entwickelt (BODANSKI, 1984), gewannen schnell Bedeutung für die Herstellung immuno-gener Steroidhormon-Protein-Konjugate (KELLIE et al., 1974; KOHEN et al., 1974) und wurden später auch zur Synthese von Mykotoxin-Protein-Konjugaten angewendet. Bedeutung kommt hier vor allem der Carbodiimidmethode (GOODFRIEND et al., 1964; BAUMINGER und WILCHEK, 1980) und der gemischten Anhydridmethode (ERLANGER et al., 1957; ERLANGER, 1980) zu. Der Ablauf und die Durchführung dieser und anderer Kopplungsreaktionen - soweit sie in den eigenen Versuchen eingesetzt wurden - sind in 3.2.1.2 beschrieben. Als makromolekulare Träger wurden meist Serumproteine wie Bovinserumalbumin (BSA), Immunglobuline, aber auch für die Versuchstiere völlig fremde Substanzen wie der Blutfarbstoff der Schüssellochnapfschnecke (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) oder synthetische Polypeptide verwendet (Tab. 5).

Die Spezifität der gewonnenen Anti-Mykotoxin-Seren hängt von der sterischen Konfiguration des verwendeten Mykotoxin-Protein-Konjugates ab (CHU, 1985). Die Teile des Toxinmoleküles, die in der Nähe der Bindungsstelle zum Protein

liegen, werden von den spezifischen Antikörpern nur schwer "erkannt", während die am weitesten vom Proteinträger entfernten Molekülteile für das Immunsystem frei zugänglich sind und für die Bindung an den Antikörper ausschlaggebend sind (LANDSTEINER, 1946). Somit kann durch die Wahl der Derivatisierungs- und Kopplungsstelle bei der Immunogensynthese die Spezifität des Antiserums in entscheidendem Maße beeinflusst werden. Auf die Affinität der Antiseren wirken sich nach ABRAHAM (1974) und PRATT (1978) geringe Immunogendosen und lange Immunisierungszeiten positiv aus. Der Rahmen für diese Einflußnahmen ist jedoch durch die genetische Kontrolle der "Antikörper-Antwort" vorgegeben (ROITT, 1984), so daß bei heterogenen Versuchstierpopulationen unterschiedliche genetische Dispositionen der Individuen die erwarteten Effekte überlagern können. In Tab. 5 ist der Großteil der bisher publizierten Arbeiten über die Gewinnung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen Mykotoxine zusammengestellt. Soweit wie möglich wurden neben Angaben zu den Derivatisierungs- und Kopplungsreaktionen auch Empfindlichkeit und Spezifität der Antiseren im verwendeten Testsystem charakterisiert.

Tabelle 5: Übersicht über die Immunogensynthese und Gewinnung von

Toxin- derivat	Träger- protein	Kopplungs-		immunisierte Tierart
		methode	rate ^{a)}	
<u>Aflatoxin B₁ -</u>				
Oxim	PLL	Carbodiimid	6	Kaninchen
Oxim	BSA	Carbodiimid	13	Kaninchen
Hemiacetal	BSA	Tetrazobenzidin	k.A.	Kaninchen
Oxim	HSA	gem. Anhydrid	32	Kaninchen
Oxim	BSA	Carbodiimid	5	Kaninchen, Ziege
Oxim	BSA	Carbodiimid	5	Kaninchen
Oxim	BSA	Carbodiimid	6-10	Kaninchen
Hemiacetal	BSA	red. Alkylierung	12	Kaninchen
Hemiacetal- hemiglutarat	BSA	gem. Anhydrid	12	Kaninchen
Oxim	BSA	Carbodiimid	23	Kaninchen
Cl ₂	BSA	direkt	14	Kaninchen
direkt	BGG	m-Chlorperoxy- Benzoessäure	40-50	Maus (MAK)
Diol	EDA-BSA	red. Alkylierung	3-7	Kaninchen
Oxim	KLH	Carbodiimid	450	Maus (MAK)
Hemiacetal	Me-BSA	direkt	38-48	Kaninchen
Oxim	BSA	akt. Ester	k.A.	Kaninchen
Oxim	BSA	Carbodiimid	k.A.	Maus (MAK)
<u>Aflatoxin G₁ -</u>				
Hemiacetal	BSA	red. Alkylierung	14-15	Kaninchen

Antiseren gegen Mykotoxine

50%-Dosis (ng/ml) ^{b)}	Kreuzreaktion mit (%) ^{c)}	Test- system	Autor(en)
4,5	B ₂ (43) G ₁ (15) G ₂ (5)	RIA	LANGONE u. VAN VUNAKIS (1976)
1,8	B ₂ (11) G ₁ (9) Q ₁ (6)	RIA	CHU und UENO (1977)
0,05	B _{2α} (100) M ₁ (50)	EIA	LAWELLIN et al. (1977)
0,13	G ₁ (< 1) B ₂ (< 1)	EIA	BIERMANN und TERPLAN (1980)
20,0	B ₂ (12) G ₁ (10) AFol(3)	RIA	GAUR et al. (1980)
40,0	B ₂ (57) G ₁ (26) AFol(9)	RIA	
10,0	AFol(178) B ₂ (131) G ₁ (31)	EIA	PESTKA et al. (1980)
4,0	G ₁ (18) B ₂ (1,8)	RIA	YANG et al. (1980)
8,4	B _{2α} (100) B ₂ (17)	EIA	GAUR et al. (1981)
1,5	B _{2α} (11) B ₂ (10)	RIA	LAU et al. (1981)
0,9 ^{d)}	B ₂ (27) M ₁ (0,4)	RIA	SIZARET et al. (1982)
1,0 ^{e)}	B ₂ (240) M ₁ (27)	RIA	
10,0 ^{f)}	B ₂ (100) M ₁ (100)	RIA	GROOPMAN et al. (1984)
0,5 ^{g)}	AFdiol(100) M ₁ (130) B _{2α} (100) AFol(20)	EIA	PESTKA und CHU (1984)
3,0	G ₁ (14) B ₂ (12) M ₁ (7)	EIA	CANDLISH et al. (1985)
10,0	B _{2α} (100) M ₁ (100)	EIA	JACKMAN (1985)
10,0	k.A.	EIA	RAM et al. (1986b)
0,2	G ₁ (22) B ₂ (20) M ₁ (13)	EIA	KAVERI et al. (1987)
16,0 ^{g)}	G ₂ (15) G ₁ (8)	EIA	CHU et al. (1985)

Fortsetzung Tabelle 5

Toxin- derivat	Träger- protein	Kopplungs-		immunisierte Tierart
		methode	rate ^{a)}	
<u>Aflatoxin M₁-</u>				
Oxim	BSA	Carbodiimid	5,5	Kaninchen
Oxim	BSA	Carbodiimid	k.A.	Maus (MAK)
Oxim	HSA	Carbodiimid	k.A.	Kaninchen
<u>Aflatoxin Q₁-</u>				
Hemisuccinat	BSA	gem. Anhydrid	26	Kaninchen
Hemiacetal	EDA-BSA	red. Alkylierung	36	Kaninchen
<u>Sterigmatocystin-</u>				
Hemiacetal	BSA	red. Alkylierung	14	Kaninchen
7-Decansäure- chlorid	BSA	direkt	9,5	Kaninchen
<u>Ochratoxin A-</u>				
direkt	BGG	Carbodiimid	37	Kaninchen
direkt	BSA	Carbodiimid	8-10	Kaninchen
direkt	BSA	gem. Anhydrid	20	Kaninchen
direkt	BSA	gem. Anhydrid	22	Kaninchen
direkt	BSA	Carbodiimid	5	Kaninchen
direkt	HGG	Carbodiimid	k.A.	Maus (MAK)
direkt	BSA	Carbodiimid	22	Maus (MAK)

50%-Dosis (ng/ml) ^{b)}	Kreuzreaktion mit (%) ^{c)}	Test- system	Autor(en)
85,0	B ₁ (56)	RIA	HARDER und CHU (1979)
25,0	B ₁ (10) G ₁ (10)	EIA	WOYCHIK et al. (1984)
0,025	B ₁ (12)	EIA	MARTLBAUER und TERPLAN (1985)
2,9 ^{h)}	AFol(38) Q ₁ (3)	RIA	FAN et al. (1984a)
1,0	B _{2α} (1) Q ₁ (1)	EIA	
3,0 ⁱ⁾	Dehydro-St.(6)	EIA	LI und CHU (1984)
1,0 ^{j)}	St(< 0,01)	EIA	MORGAN et al. (1986a)
1000,0	k.A.	RIA	AALUND et al. (1975)
3,0 ^{*)}	OC(37)	RIA	CHU et al. (1976)
k.A.	k.A.		WORSAAE (1978)
3,0	Oα(2,4)	EIA	MORGAN et al. (1983)
150,0	k.A.	RIA	ROUSSEAU et al. (1985)
500,0 ^{j)}	OC(150) Oα(39)	EIA	CANDLISH et al. (1986)
5,0	OB, Oα(< 0,001)	RIA	ROUSSEAU et al. (1987)

Fortsetzung Tabelle 5

Toxin- derivat	Träger- protein	Kopplungs-		immunisierte Tierart
		methode	rate ^{a)}	
<u>Zearalenon-</u>				
Oxim	BSA	Carbodiimid	7	Schwein
Oxim	BSA	gem. Anhydrid	20	Kaninchen
Oxim	BSA	gem. Anhydrid	20	Schwein
Oxim	BSA	akt. Ester	k.A.	Kaninchen
Oxim	BSA	akt. Ester	6	Maus (MAK)
<u>T-2 Toxin-</u>				
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	6-7	Kaninchen
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	k.A.	Kaninchen
Hemiglutarat	GGG	Carbodiimid	10-20	Maus (MAK)
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	k.A.	Maus (MAK)
β -Oxim	BSA	Carbodiimid	8	Kaninchen
α -Oxim	BSA	Carbodiimid	10	Kaninchen
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	k.A.	Maus (MAK)
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	k.A.	Maus (MAK)
<u>HT-2 Toxin-</u>				
Oxim	BSA	Carbodiimid	17	Kaninchen
<u>T-2 Tetraoltetracetat-</u>				
Oxim	BSA	Carbodiimid	21	Kaninchen

50%-Dosis (ng/ml) ^{b)}	Kreuzreaktion mit (%) ^{c)}	Test- system	Autor(en)
5,0	α Zol(100) β Zol(44)	RIA	THOUVENOT und MORFIN (1983)
3,0	α Zol(50) β Zol(12)	EIA	LIU et al. (1985)
75,0	α Zol(33) β Zol(25)	EIA	PESTKA et al. (1986)
5,8	α Zol(280) β Zol(35)	EIA	WARNER et al. (1986)
4,0	α Zol(107) β Zol(29)	EIA	DIXON et al. (1987)
3,5 ^{*)}	HT-2(17)	RIA	CHU et al. (1979)
5,0	AcT-2(1000) HT-2(13)	EIA	PETERS et al. (1982)
10000	HT-2(30)	EIA	HUNTER et al. (1985)
10000	HT-2(390)	EIA	
0,26 ^{*)}	AcT-2(> 1000)	EIA	OHTANI et al. (1985)
0,17 ^{*)}	AcT-2(48) HT-2(34)	RIA	ZHANG et al. (1986a)
0,2 ^{*)}	AcT-2(22) HT-2(17)	RIA	
23,0	3'OH T-2(127)	EIA	GENDLOFF et al. (1987)
	AcT-2(24) 3'OH HT-2(23)		
350	AcT-2(75) HT-2(35)	EIA	HACK et al. (1987)
	T-2 Triol(22)		
0,62	T-2(25) IsoT-2(10)	RIA	FAN et al. (1987)
1,0		RIA	FAN et al. (1987)

Fortsetzung Tabelle 5

Toxin- derivat	Träger- protein	Kopplungs-		immunisierte Tierart
		methode	rate ^{a)}	
<u>3'Hydroxy-T-2 Toxin-</u>				
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	6-8	Kaninchen
<u>3-Acetyl-Neosolaniol-</u>				
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	17	Kaninchen
<u>Diacetoxyscirpenol-</u>				
Hemiglutarat	BSA	Carbodiimid	10	Kaninchen
Oxim	BSA	Carbodiimid	11	Kaninchen
Hemiglutarat	HSA	Carbodiimid	k.A.	Kaninchen
<u>Deoxyverrucarol-</u>				
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	16	Kaninchen
<u>Dihydroxycalonectrin-</u>				
Hemisuccinat	BSA	Carbodiimid	10	Kaninchen
<u>Roridin A-</u>				
Dihemisuccinat	HSA	akt. Ester	13	Kaninchen

50%-Dosis (ng/ml) ^{b)}	Kreuzreaktion mit (%) ^{c)}	Test- system	Autor(en)
0,4 ^{a)}	T-2(25) AcT-2(36) 3'OH AcT-2(20)	RIA	WEI et al. (1986)
0,34 ^{a)}	AcT-2(100) 3'OH T-2(57) DAS(14)	RIA	WEI und CHU (1987)
15,0	4-MAS(1) 15-MAS(< 1)	RIA	CHU et al. (1984a)
4,2 ^{a)}	4-MAS(26) 15-MAS(21)	RIA	ZHANG et al. (1986a)
0,08	3 α -Ac-DAS(597) T-2(5)	EIA	KLAFFER et al. (1988)
3,2	Verrucarol(< 0,1)	RIA	CHU et al. (1984b)
1,0 ^{a)}	T-2 tetraoltetra- acetat (< 1)	RIA	ZHANG et al. (1986b)
12,0	RJ(40) VA(15) SH(15) SG(6,5)	EIA	MÄRTLBAUER et al. (1988)

Legende zu Tabelle 5:

- a) mol Toxinderivat/mol Trägerprotein
- b) Toxinmenge, die im kompetitiven Testsystem die Bindung des markierten Toxinanalogs um 50% verringert
- c) es sind nur die am stärksten kreuzreagierenden Substanzen (in der Regel > 5%) angegeben
- d) Affinitätskonstante: $2,5 \times 10^9$ l/mol
- e) Affinitätskonstante: $2,0 \times 10^9$ l/mol
- f) Affinitätskonstante: $1,0 \times 10^9$ l/mol
- g) 50%-Dosis hier für Aflatoxin G_1 -Hemiacetal
- h) 50%-Dosis hier für Aflatoxin B_1
- i) 50%-Dosis hier für Sterigmatocystin-Hemiacetal
- j) Affinitätskonstante: $6,2 \times 10^7$ l/mol
- j) Affinitätskonstante: $1,1 \times 10^9$ l/mol
- *) Konzentrationsangabe in ng/Ansatz (kann ungefähr mit einem Faktor 10-40 in ng/ml hochgerechnet werden)

Abkürzungen:

Mykotoxine:

3α -Ac-DAS = 3α -Acetyldiacetoxyscirpenol; AcT-2 = Acetyl-T-2 Toxin;
APdiol = Aflatoxin B_1 -Diol; APol = Aflatoxicol; B_1 = Aflatoxin B_1 ;
 B_2 = Aflatoxin B_2 ; $B_2\alpha$ = Aflatoxin $B_2\alpha$; DAS = Diacetoxyscirpenol;
 G_1 = Aflatoxin G_1 ; G_2 = Aflatoxin G_2 ; HT-2 = HT-2 Toxin; isoT-2 = IsoT-2 Toxin; M_1 = Aflatoxin M_1 ; 4-MAS = 4-Monoacetoxyscirpenol; 15-MAS = 15-Monoacetoxyscirpenol; O α = Ochratoxin α ; OB = Ochratoxin B; OC = Ochratoxin C; 3'OH AcT-2 = 3'Hydroxyacetyl-T-2 Toxin; 3'OH T-2 = 3'Hydroxy-T-2 Toxin; Q_1 = Aflatoxin Q_1 ; RJ = Roridin J; SG = Satratoxin G; SH = Satratoxin H; St = Sterigmatocystin; VA = Verrucarin A; α -Zol = α -Zearalenol; β -Zol = β -Zearalenol;

Sonstige:

BSA = Bovinserumalbumin; BGG = bovines γ -Globulin;
EDA-BSA = Ethylendiamin-modifiziertes Serumalbumin (CHU et al., 1982);
HSA = Humanserumalbumin; k.A. = keine Angaben; KLH = Keyhole Limpet Hemocyanin; MAK = monoklonaler Antikörper; Me-BSA = methyliertes BSA;
PLL = Poly-l-Lysin;

2.2.2.2 Markierte Mykotoxine

Obwohl zum Nachweis von niedermolekularen Substanzen eine Vielzahl immunchemischen Verfahren entwickelt wurde, die unter anderem auf der Messung von Chemilumineszenz (KOHEN et al., 1980), Fluoreszenz (SOINI und HEMMILA, 1979), zeitverzögerter Fluoreszenz (SOINI und KOJOLA, 1983) und der Elektronenspinresonanz (BRANDON et al., 1985) entsprechend markierter Antigene beruhen, wurden zur Analyse von Mykotoxinen meist radioimmunologische (RIA) und enzymimmunologische (EIA) Testsysteme eingesetzt (CHU, 1984). Jüngst wurden ein fluoreszenzimmunologisches (WARDEN et al., 1987) und ein homogenes, auf der Lysis von Liposomen beruhendes Verfahren zum Nachweis von T-2 Toxin (LIGLER et al., 1987) beschrieben. Die Eignung dieser Methoden zur Untersuchung von Probenmaterialien auf T-2 Toxin wurde allerdings noch nicht nachgewiesen. In Tab. 6 sind die wichtigsten Arbeiten zur Herstellung radioaktiv- oder enzymmarkierter Mykotoxine aufgelistet.

Tabelle 6: Herstellung radioaktiv- oder enzymmarkierter Mykotoxine

Mykotoxin (-derivat)	Marker	Kopplungs- methode ^{a)}	Autor(en)
Aflatoxin B ₁ -Hemiacetal	HRP ^{b)}	Tetrazobenzidin	LAWELLIN et al. (1977)
Aflatoxin B ₁ -Oxim	HRP	gem. Anhydrid	BIERMANN und TERPLAN (1980)
Aflatoxin B ₁ -Oxim	HRP	Carbodiimid	PESTKA et al. (1980)
Aflatoxin B ₁ -Hemiacetal	HRP	red. Alkylierung	GAUR et al. (1981)
Aflatoxin B ₁ -Dihydrodiol	HRP	red. Alkylierung	PESTKA und CHU (1984)
Aflatoxin B ₁ -Hemiacetal	APC ^{c)}	direkt	JACKMAN (1985)
Aflatoxin B ₁ -Oxim	HRP	aktiver Ester	RAM et al. (1986b) SINGH und LANG (1987)
Aflatoxin B ₁ -Oxim	¹²⁵ I		FUKAL et al. (1987)
Aflatoxin M ₁ -Oxim	HRP	Carbodiimid	PESTKA et al. (1981a)
Aflatoxin Q ₁ -Hemiacetal	HRP	red. Alkylierung	FAN et al. (1984a)
Aflatoxin G ₁ -Hemiacetal	HRP	red. Alkylierung	CHU et al. (1985)

Fortsetzung Tabelle 6

Mykotoxin (-derivat)	Marker	Kopplungs- methode ^{a)}	Autor(en)
Ochratoxin A- Eialbumin-Konjugat	¹²⁵ J		AALUND et al. (1975)
Ochratoxin A	HRP	Carbodilimid	PESTKA et al. (1981c)
Ochratoxin A	¹⁴ C		ROUSSEAU et al. (1984)
Sterigmatocystinhemiacetal	HRP	red. Alkyllierung	LI und CHU (1984)
Zearalenon	³ H		THOUVENOT und MORFIN (1983)
Zearalenon-Oxim	HRP	aktive Ester	WARNER et al. (1986)
T-2 Toxin	³ H		WALLACE et al. (1977)
T-2 Toxin-Hemisuccinat	HRP	Carbodilimid	PESTKA et al. (1981b)
3'OH-T-2 Toxin	³ H		WEI et al. (1986)
HT-2 Toxin	³ H		FAN et al. (1987)
T-2 Tetraol	³ H		FAN et al. (1987)
T-2 Tetraoltetracetat	³ H		FAN et al. (1987)
Diacetoxyscirpenol	³ H		CHU et al. (1984a)
Diacetoxyscirpenolhemisucc.	HRP	aktive Ester	KLAFFER et al. (1988)
Deoxyverrucarol	³ H		CHU et al. (1984b)
Triacetyldeoxynivalenol	³ H		ZHANGH et al. (1986b)
Roridin A-Hemisuccinat	HRP	aktive Ester	MÄRTLBAUER et al. (1988)

a) nur für enzymmarkierte Toxine
c) alkalische Phosphatase

b) Meerrettichperoxidase

2.2.2.3 Nachweis von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln

Der Vorteil immunchemischer Verfahren gegenüber den chemisch-physikalischen Methoden liegt vor allem in der Einfachheit der Arbeitsschritte, der Möglichkeit zur Automatisierung und der daraus resultierenden Kosteneinsparung (NEWSOME, 1986). Flüssige Proben wie Milch, Serum oder Urin können nach ausreichender Verdünnung meist direkt im EIA eingesetzt werden. Feste Proben müssen zunächst extrahiert werden und in den meisten Fällen wurde der gewonnene wässrige Extrakt - nach ausreichender Verdünnung - ohne weitere Aufbereitung analysiert. Für kritische Proben oder zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit empfiehlt sich die Aufreinigung des Rohextraktes durch Säulenchromatographie oder Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie. Besonders bewährt hat sich die Verwendung kommerziell erhältlicher Einmalkartuschen (CHU, 1984).

2.2.2.3.1 Radioimmunologische Nachweisverfahren (RIA)

Der RIA ist ein kompetitives Testverfahren nach dem in 2.2.1.3 beschriebenen Prinzip. Zur Entwicklung radioimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen wurden hauptsächlich mit Tritium markierte Toxinanaloga verwendet (Tab. 6). Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich vor allem in der Methode, die zur Trennung von freiem und gebundenem Toxin angewendet wird. Neben der Ausfällung der Immunglobuline mit Ammoniumsulfat (LEE und CHU, 1981a), der Verwendung einer "Double antibody technique" (LANGONE und VAN VUNAKIS, 1976) oder direkt an eine Festkörperphase gebundener Antikörper (SUN und CHU, 1977) wurde auch Aktivkohle (THOUVENOT und MORFIN, 1981) zur Abtrennung nicht gebundener Toxinmoleküle eingesetzt. Tab. 7 gibt einen Überblick über radioimmunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln, wobei neben der Nachweisgrenze auch die vor der Analyse durchgeführten Extraktions- und Reinigungsschritte berücksichtigt sind.

2.2.3.2 Enzymimmunologische Nachweisverfahren (EIA)

Nach der in 2.2.1.3 gegebenen Definition sind die Enzymimmunotests zum Nachweis von Mykotoxinen als kompetitive Testverfahren einzustufen. Im Unterschied zum RIA wird zur Markierung der Toxine ein Enzym anstelle von radioaktiven Isotopen verwendet (Tab. 6). Mit lediglich einer Ausnahme (JACKMAN, 1985) wurde für alle beschriebenen Testsysteme Meerrettichperoxidase als Enzym eingesetzt. Neben dem direkt kompetitiven Test - analog zum RIA - wurden zur Durchführung der in Tab. 8 aufgeführten Testsysteme auch indirekte kompetitive Verfahren eingesetzt (zur Erklärung der Begriffe siehe 3.2.2.1).

Tabelle 7: Radiomunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln

Proben-		Nachweis- grenze (µg/kg)	Autor(en)
matrix	extraktion aufbereitung		
<u>Aflatoxin B₁</u>			
Mais, Erdnußbutter	AOAC-Methode	26.042	1,0
Mais, Weizen Erdnußbutter	Chloroform	keine	3,0
	MeOH/W/Hexan	Rückextr. in Chloroform	6,0
Erdnüsse	Chloroform	k.A.	0,8
<u>Aflatoxin M₁</u>			
Milch	Aceton	Entfetten mit Hexan Rückextr. in Chloroform	0,5
Milch	C ₁₈ -Elnmalkartusche		0,003
Milchpulver Eipulver	k.A.	k.A.	k.A.
	k.A.	k.A.	k.A.

Fortsetzung Tabelle 7

matrix	Proben-		Nachweis- grenze ($\mu\text{g/kg}$)	Autor(en)
	extraktion	aufbereitung		
<u>Ochratoxin A</u>				
Hafer	Chloroform mlt 0,5% H_3PO_4	Silicagelkartusche	k.A.	ROUSSEAU et al. (1985)
Niere (Schwein)	Chloroform mlt 0,5% H_3PO_4	C_{18} -Einmalkartusche u. Silicagelkartusche	0,2	ROUSSEAU et al. (1987)
<u>T-2 Toxin</u>				
Milch	C_{18} -Einmalkartusche		2,5	LEE und CHU (1981b)
Mais, Weizen	Methanol	C_{18} -Einmalkartusche	2,5	LEE und CHU (1981a)
Mais	Aceton	C_{18} -Einmalkartusche	10,0	WEI und CHU (1987)
<u>Deoxynivalenol</u>				
Weizen, Mais	Acetonitril(168)	Acetylierung	20,0	XU et al. (1986)
	Wasser (32)	u. C_{18} -Einmalkartusche		
	Hexan (200)			

k.A. = keine Angaben

Tabelle 8: Enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebens- und Futtermitteln

matrix	Proben-		Nachweis- grenze (µg/kg)	Autor(en)
	extraktion	aufbereitung		
<u>Aflatoxin B₁</u>				
Mais, Weizen	Chloroform	keine	3,0	EL NAKIB et al. (1981)
Erdnußbutter	MeOH/W/Hexan	Rückextr. in Chloroform	3,0	
Erdnüsse	MeOH/PBS(1/1)	keine	0,5	BIERMANN und TERPLAN (1982)
Mais, Erdnußbutter	AOAC- Methode	26.026	5,0	FAN und CHU (1984)
Erdnußbutter	55% MeOH/Hexan(2,5/1)	keine	2,5	RAM et al. (1986a)
Mais, Baumwollsaamen	MeOH/W/DMF(70/29/1)	keine	k.A.	RAM et al. (1986b)
Cerealienhaltige Lebensmittel	MeOH/W/DMF(70/29/1)	keine	5,0	WARNER und PESTKA (1987)
<u>Aflatoxin M₁</u>				
Milch	keine	keine	0,25	PESTKA et al. (1981a)
Milch und Milchprodukte	C ₁₈ -Enmalkartusche		0,05	FREMY et al. (1984)
	Dichlormethan	Silica-Enmalkartusche	0,01-0,06	
Milch	C ₁₈ -Enmalkartusche		0,01	HU et al. (1984)
Milch	C ₁₈ -Enmalkartusche		0,1	JACKMAN (1985)
Milch, Milchpulver	C ₁₈ -Enmalkartusche		0,005	MÄRTLBAUER und TERPLAN (1986)

Fortsetzung Tabelle 8

matrix	Proben-		Nachweis- grenze (µg/kg)	Autor(en)
	extraktion	aufbereitung		
<u>Ochratoxin A</u>				
Gerste	Chloroform	keine	0,06	MORGAN et al. (1983)
Weizen	MeOH	Rückextr. in Bicarbonat	1,0	LEE und CHU (1984)
Niere (Schwein)	Chloroform	Rückextr. in Bicarbonat	0,5	MORGAN et al. (1986b)
<u>T-2 Toxin</u>				
Milch	C ₁₈ -Einmalkartusche		0,2	FAN et al (1984 b)
Mais	MeOH/W(6/4)	keine	0,05	GENDLOFF et al. (1984)
<u>Zearalenon</u>				
Mais	MeOH/W/DMF/(70/29/1)	keine	50,0	WARNER et al. (1986)
Mais	MeOH/W(7/3)	keine	50,0	DIXON et al. (1987)
Cerealienhaltige Lebensmittel	MeOH/W/DMF(70/29/1)	keine	2,5	WARNER und PESTKA (1987)

Abkürzungen: DMF = Dimethylformamid; MeOH = Methanol; PBS = Phosphatpuffer; W = Wasser; k.A. = keine Angaben

3 E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

4-Aminobenzoesäurehydrazid (Aldrich Chemie GmbH, A4,190-9)
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Sigma Chemie GmbH, A 6154)
Bernsteinsäureanhydrid (Aldrich Chemie GmbH, 13,441-4)
Bovinseryumalbumin (Sigma Chemie GmbH, A 9647)
Carboxymethoxylamin-Hemihydrochlorid (Aldrich Chemie GmbH, C1,340-8)
N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid (Sigma Chemie GmbH, D 3128)
Dimethylformamid (Sigma Chemie GmbH, D 8654)
Ethanolamin (Sigma Chemie GmbH, E 9508)
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl-)carbodiimid (Sigma Chemie GmbH, E 6383)
Fetales Kälberserum (Sigma Chemie GmbH, F 4010)
Glutarsäureanhydrid (Sigma Chemie GmbH, G 8136)
Humanseryumalbumin (Sigma Chemie GmbH, A 8763)
N-Hydroxysuccinimid (Sigma Chemie GmbH, H 7377)
Isobutylchlorocarbonat (Sigma Chemie GmbH, I 3253)
Keyhole Limpet Hemocyanin ((Sigma Chemie GmbH, H 2133)
Meerrettichperoxidase (Sigma Chemie GmbH, P 8375)
Natriumborhydrid (Sigma Chemie GmbH, S 9125)
Natriumnitrit (Sigma Chemie GmbH, S 2252)
Pyrogallol (Sigma Chemie GmbH, P 0381)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma Chemie GmbH, T 2885)
Tri-n-butylamin (Aldrich Chemie GmbH, 24,026-5)
Tween 20 (Sigma Chemie GmbH, P 1379)

Alle weiteren nicht eigens aufgeführten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von der Firma Merck in der Reinheitsstufe p.A. bezogen.

3.1.2 Mykotoxine

Die Mykotoxine Nivalenol, Deoxynivalenol und Fusarenon X wurden von der Firma Wako Chemie GmbH bezogen, die makrozyklischen Trichothecene Roridin J, Satratoxin G und H wurden freundlicherweise vom Institut für Biochemie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Toxine wurden von der Firma Sigma Chemie GmbH bezogen.

3.1.3 Puffer und Lösungen

0,1 mol/l Acetatpuffer (mit 0,5 mol/l Natriumchlorid, pH 4,0)

0,1 mol/l Boratpuffer (pH 9,2)

0,1 mol/l Boratpuffer (mit 0,5 mol/l Natriumchlorid, pH 8,0)

0,05 mol/l Bicarbonatpuffer (pH 9,6)

0,21 mol/l Citratpuffer (mit 3,15 mmol/l H_2O_2 , pH 3,9)

0,1 mol/l Glycinpuffer (pH 2,5)

0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH 6,0)

0,05 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,5)

0,01 mol/l Phosphatpuffer (mit 0,01% Natriumazid, pH 7,3)

0,01 mol/l Phosphatpuffer (PBS), (mit 0,12 mol/l Natriumchlorid, pH 7,3)

0,1 mol/l Tris/HCl-Puffer (mit 0,1 mol/l Na_2SO_4 , pH 6,5)

3% FKS/PBS-Lösung (3% fetales Kälberserum in PBS)

Natriumbicarbonatlösung (0,13 mol/l)

Natriumbicarbonatlösung (0,1 mol/l mit 0,5 mol/l Natriumchlorid)

Tetramethylbenzidinlösung (1 mmol 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol)

Pyrogallollösung (0,4 mol/l)

Substratlösung für 3.2.2.2.3 nach GALLATI und PRACHT (1985):

20 Teile Citratpuffer + 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

Substratlösung für 3.2.1.3.2 (0,32 ml 0,1 mol/l Phosphatpuffer + 0,16 ml

0,147 mol/l H_2O_2 + 0,32 ml Pyrogallollösung + 2,1 ml A. dest.)

Waschlösung (0,15 mol/l Natriumchlorid mit 0,25% Tween 20-Zusatz)

Zur Durchführung der Enzymimmuntests (3.2.2.2) wurden die Toxin-Lösungen in PBS mit 10% Methanolzusatz, die Toxin-Enzym-Konjugat-Lösungen in PBS mit Zusatz von 1% fetalem Kälberserum (FKS) und die Anti-Toxin-Serumverdünnungen in PBS hergestellt. Beim Verfahren zum Nachweis von Ochratoxin A wurde in allen Puffern und Lösungen FKS durch 0,25% Tween 20 ersetzt.

Die Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Lösung zur Durchführung des indirekten Enzymimmuntests wurde in PBS mit 1% Bovinserumalbumin(BSA)-Zusatz 1:1000 verdünnt eingesetzt.

3.1.4 Geräte

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Pumpen:	Modell 510 (Waters GmbH)
Probengeber:	Modell 712 (Waters GmbH)
Säulen:	4,6 x 250 mm und 20,5 x 250 mm mit Vorsäule 4,6 x 20 mm bzw. 20,5 x 20 mm (Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH) Säulenfüllung: Lichrospher RP8, 5 µm Partikeldurchmesser (Merck GmbH) 7,6 x 300 mm I-125 Proteintrennsäulen (Waters GmbH)
Detektoren:	Diodenarraydetektor Modell 2180 (LKB) Fluoreszenzdetektor Modell RF-530 (Shimadzu GmbH) Differentialrefraktometer Modell LCD 202 (Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH)
Fraktionensammler:	Modell 202 (Gilson)
Datenverarbeitung:	Personalcomputer AT02 (IBM) mit Interface Modell 760 (Nelson Analytical Inc.), Nelson Analytical 3000 Chromatographiesoftware und Wavescan EG-Software (LKB)

Enzymimmunotests

Variable Pipetten 10-100 μ l und 100-1000 μ l (Eppendorf Gerätebau GmbH)

Variable 12-Kanalpipette 50-250 μ l (Flow GmbH)

Mikrotiterplatten (Immuno Plate I, Nunc GmbH)

Mikrotiterplattentaumelgerät (Heidolph GmbH)

Mikrotiterplattenlesegerät (ELISA-Autoreader MR 580, Dynatech GmbH)

Datenverarbeitung: Computer HP 85B (Hewlett Packard GmbH)

oder Personalcomputer AT03 (IBM)

Sonstiges

Dialyseschlauch 6 mm $\emptyset$ (Servapor, 44139)

Kaliumjodidstärkepapier (Machery-Nagel, 90754)

Kieselgel-60-Platten (Merck GmbH, 5724)

Kieselgel-60-Platten mit Fluoreszenzindikator (Sigma Chemie GmbH, T 7270)

Sephadexsäule 50 x 1,6 cm (Pharmacia GmbH)

Sepharose 6 MB (Sigma Chemie GmbH, C 9267)

Sep-pak C₁₈-Einmalkartuschen (Waters GmbH)

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellung der Immunoreagenzien

3.2.1.1 Mykotoxinderivate

3.2.1.1.1 Chromatographische Überprüfung der Mykotoxine

Zur dünn-schichtchromatographischen (DC) Überprüfung wurden entweder Kieselgel-60-Platten oder mit Fluoreszenzindikator (F_{254nm}) beschichtete Platten verwendet. Die Entwicklung und Detektion der Toxine erfolgte unter den in Tab. 9 angegebenen Bedingungen. Die Analysen mit der Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden unter den in Tab. 10 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Als stationäre Phase fand eine Stahlsäule (4,6 x 250 mm) Verwendung, die mit C_8 -Material (Lichrospher RP 8, 5 μm Partikel-durchmesser) gefüllt war. Mit dem Diodenarraydetektor wurden während der Analyse UV-Spektren von 190 - 370 nm im Abstand von 1 sec aufgezeichnet.

3.2.1.1.2 Reinigung und Quantifizierung der Mykotoxine

Aflatoxin $B_{2\alpha}$ wurde nach der von POHLAND et al. (1968) beschriebenen Methode durch säurekatalysierte Addition von Wasser an die Vinyl-Ether-Doppelbindung des Aflatoxin B_1 hergestellt.

Aflatoxin M_1 stand als teilweise vorgereinigter Kulturextrakt (*Aspergillus flavus* NRRL 3251) zur Verfügung. Die chromatographische Überprüfung zeigte neben Aflatoxin M_1 , M_2 und B_1 einige weitere fluoreszierende Verunreinigungen, die keinen Aflatoxinstandards zugeordnet werden konnten. Der Extrakt wurde deshalb mittels präparativer HPLC aufgearbeitet. Als stationäre Phase diente eine Stahlsäule (250 x 16 mm; gefüllt mit gebrochenem C_{18} -Material mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 10 μm). Aflatoxin M_1 wurde mit einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (35 + 65) bei einem Fluß von 11,25 ml/min eluiert. Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei 350 nm. Die Aflatoxin M_1 -haltigen Fraktionen (Retentionszeit 17,6 min) wurden vereinigt, mit Chloroform extrahiert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Die Quantifizierung der Mykotoxine erfolgte nach dem Gesetz von *Bouguer-Lambert-Beer* ($E = \epsilon \times c \times d$; mit E = Extinktion; c = Konzentration (mol/l); d = Schichtdicke (mm); ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (Tab. 1-3)).

Tabelle 9: DC-Bedingungen zum Nachweis von Mykotoxinen

Toxin	Rf-Wert	Fließmittel-System	Detektion
Aflatoxin M ₁	0,64	Chloroform/Aceton/	blaue Fluoreszenz
Aflatoxin M ₁ - Oxim	0,29	Essigsäure 50/50/10	unter UV-Licht (350nm)
Aflatoxin B ₁	0,82	Diethylether/Methanol/	blaue Fluoreszenz
Aflatoxin B ₁ - Oxim	0,70	Essigsäure 96/18/6	unter UV-Licht (350nm)
Aflatoxin B _{2α}	0,13	Chloroform/Methanol 98/2	blaue Fluoreszenz unter UV-Licht (350nm)
Ochratoxin A	0,74	Chloroform/Aceton/ Essigsäure 90/5/5	grüne Fluoreszenz unter UV-Licht (350nm)
Nivalenol	0,63	Dichlormethan/Methanol/	a), b)
Nivalenol- Oxim	0,51	Essigsäure 80/20/10	
Fusarenon X	0,54	Ethylacetat/n-Hexan/	a), b)
Fusarenon X- Oxim	0,28	Essigsäure 75/25/5	
Fusarenon X- Hydrazon	0,75		
Roridin A	0,72	Ethylacetat/n-Hexan/	a), b)
Roridin A- Hemisuccinat	0,80	Essigsäure 75/25/5	

a) dunkler Fleck auf Platten mit Fluoreszenzindikator (254 nm)

b) blaue Fluoreszenz unter UV-Licht (360 nm) nach Derivatisierung
(SANO et al., 1982)

Tabelle 10: HPLC-Bedingungen zum Nachweis von Mykotoxinen

Toxin	Retentionszeit (min)	Eluent	Fluß (ml/min)
Aflatoxin M ₁	6,13	Wasser/Acetonitril/Essigsäure 65/35/0,2	1,0
Aflatoxin M ₁ - Oxim	7,07		1,0
Aflatoxin B ₁	15,00	linearer Gradient von Wasser/ Methanol/Essigsäure 50/50/0,2	0,7
Aflatoxin B ₁ - Oxim	16,20	nach 100% Methanol in 15 min	0,7
Aflatoxin B _{2α}	7,12	Wasser/Methanol 40/60	0,7
Ochratoxin A	6,28	Wasser/Acetonitril/Essigsäure 47/51/2	1,0
Nivalenol	8,41	Wasser/Methanol/Essigsäure 80/20/0,2	0,7
Nivalenol- Oxim	13,33		0,7
Fusarenon X	8,45 (8,47) ^{a)}	Wasser/Methanol/Essigsäure 50/50/0,5	0,5
Fusarenon X- Oxim	8,43 (4,55) ^{a)}		0,5
Roridin A	12,40	Wasser/Methanol/Essigsäure 65/35/0,2	0,7
Roridin A- Dihemisuccinat	16,19		0,7
Verrucarín A	9,07	Wasser/Methanol/Essigsäure 30/70/0,2	0,7
Verrucarín A- Hemiglutarat	10,46		0,7

a) Retentionszeit für Eluent ohne Essigsäurezusatz

3.2.1.1.3 Derivatisierung

Die Mykotoxine Aflatoxin M₁ und B₁, Nivalenol, Fusarenon X, Roridin A und Verrucarlin A besitzen keine reaktive Gruppe, die zur direkten Kopplung an einen Proteinträger benutzt werden kann. Deshalb wurden die Toxine mit einer Carbonylfunktion (Aflatoxin M₁, B₁, Nivalenol und Fusarenon X) entweder mit einem Hydroxylamin- oder einem Hydrazinderivat umgesetzt, während die Toxine mit einer Hydroxygruppe (Roridin A, Verrucarlin A) mit einem Dicarbonsäureanhydrid derivatisiert wurden (Abb. 5).

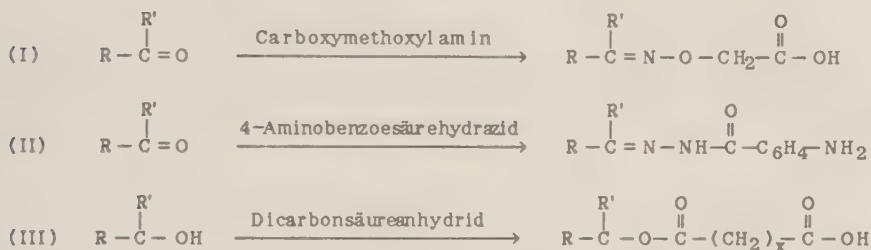


Abbildung 5 : Umsetzung von Mykotoxinen mit Carboxymethoxylamin zu einem Oxim (I), mit Aminobenzoesäurehydrazid zu einem Hydrazon (II) oder mit Bernsteinsäureanhydrid bzw. mit Glutarsäureanhydrid zu einem Hemisuccinat (x=2) bzw. Hemiglutarat (x=3) (III)

Die eingesetzten Mengen an Toxin und Reagenz sowie die genauen Reaktionsbedingungen sind in Tab. 11 angegeben. Der zeitliche Verlauf der Umsetzung wurde chromatographisch mit den in Tab. 9 und 10 angegebenen Bedingungen verfolgt.

3.2.1.1.4 Reinigung von Mykotoxinderivaten

Die resultierenden Derivate wurden mittels präparativer HPLC aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Die Reaktionsansätze wurden dazu unter Stickstoff getrocknet, in 1-2 ml Methanol gelöst und in die HPLC-Anlage injiziert.

Tabelle 11: Derivatisierung von Mykotoxinen

Toxin		Reagenz		Reaktionsbedingungen		
Bezeichnung	Menge (mg)	Bezeichnung	Menge (mg)	Temp. (°C)	Zeit (h)	Lösungsmittel (Volumen)
Aflatoxin M ₁	2,2	Carboxy-methoxyamin	12,5	RD ^a	6	Pyridin/Methanol/Wasser 1/4/1 (12 ml)
Aflatoxin B ₁	10,0	Carboxy-methoxyamin	25,0	RD	2	Pyridin/Methanol/Wasser 1/4/1 (6 ml)
Nivalenol	10,0	Carboxy-methoxyamin	60,2	20	24	Methanol/Wasser (0,7 ml) 5/2 (+50 µmol Na-acetat)
Fusarenon X	10,0	Carboxy-methoxyamin	60,2	20	24	Methanol/Wasser (0,7 ml) 5/2 (+50 µmol Na-acetat)
	2,5	4-Aminobenzoesäurehydrazid	20,0	60	1	Methanol/Wasser (0,7 ml) 5/2 (+50 µmol Na-acetat)
Roridin A	25,0	Bernsteinsäureanhydrid	100,0	100	1	Pyridin (1 ml)
Verrucarlin A	25,0	Glutarsäureanhydrid	100,0	100	2	Pyridin (1 ml)

a) RD = Rückflussdestillation

Die präparativen Trennbedingungen entsprachen den in Tab. 10 für die jeweiligen Toxine angegebenen analytischen Bedingungen. Es wurde jedoch eine präparative Säule (250 x 20,5 mm; gefüllt mit Lichrospher C₈-Material, 5 µm Partikeldurchmesser) verwendet und der Fluß dem größeren Säulenvolumen entsprechend um den Faktor 20 erhöht. Das Eluat wurde in Fraktionen von 5 ml aufgefangen und mittels analytischer HPLC (Tab. 10) und DC (Tab. 9) überprüft. Die Fraktionen mit dem Toxinderivat wurden vereinigt, unter Stickstoff konzentriert und lyophilisiert.

3.2.1.1.5 Ergebnisse

Bei der chromatographischen Überprüfung der verwendeten Mykotoxine konnten weder in der HPLC noch in der DC Verunreinigungen nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen der beiden Methoden lagen die Toxine in einem Reinheitsgrad von mehr als 95 % vor.

Bei der Umsetzung von Aflatoxin M₁, B₁, Nivalenol und Fusarenon X zu Oximen bzw. Hydrazonen entstanden die gewünschten Produkte als Hauptderivate neben einigen Beiprodukten, während bei der Herstellung von Roridin A-Hemisuccinat bzw. Verrucaridin A-Hemiglutarat kaum Nebenprodukte detektiert wurden. Die Reinigung der Derivate wurde deshalb hauptsächlich zur Abtrennung der im Überschuß zugesetzten Derivatisierungsreagenzien durchgeführt. Die Retentionszeiten der Toxinderivate in der HPLC und die R_F-Werte in der DC sind in Tab. 10 bzw. 9 zusammengestellt.

Die Identität des Aflatoxin M₁-Oxims und Aflatoxin B₁-Oxims konnte durch den Vergleich der ermittelten Daten mit den Angaben in der Literatur (CHU et al., 1977; HARDER und CHU, 1979) bestätigt werden. Da Roridin A zwei Hydroxygruppen besitzt, die beide mit Essigsäureanhydrid verestert werden können (BÖHNER und TAMM, 1966), wurde das derivatisierte Produkt durch Massenspektrometrie und ¹H-Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR) charakterisiert.^{*)} Das Massenspektrum nach chemischer Ionisation ergab m/z 733 für das

^{*)} Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Dr. M. Gareis (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität München) durchgeführt, die Kernresonanzspektren von Dr. A. Hammann (Hoechst AG, Frankfurt) aufgenommen. Beiden sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

protonierte Molekularion und m/z 761 ($M+C_2H_5$)⁺ bzw. m/z 773 ($M+C_3H_5$)⁺ für die Adduktionen, die charakteristischerweise im Methanplasma gebildet werden. Die ¹H-NMR-Spektren zeigten signifikante Unterschiede zwischen Roridin A und dem Derivat. Die Protonensignale an C_{13'}, C_{6'} und C_{2'} (HABERMEHL et al., 1985) zeigten eine chemische Tieffeldverschiebung von $\delta = 3,61$; 3,52 bzw. 4,07 ppm (Roridin A) nach $\delta = 4,90$; 3,80 bzw. 5,00 ppm (Derivat). Beide Ergebnisse zusammen bestätigten, daß die neue Verbindung das Dihemisuccinatderivat des Roridin A darstellt.

Für die übrigen erstmals synthetisierten Toxinderivate konnte aufgrund der sehr spezifischen Derivatisierungsreaktionen und der Tatsache, daß immer nur eine entsprechende reaktive Gruppe (Hydroxy- bzw. Carbonylgruppe) im Molekül vorhanden war, davon ausgegangen werden, daß die gewünschten Produkte entstanden waren. Die isolierten Derivate zeigten im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen deutliche Unterschiede in ihrem chromatographischen Verhalten (Tab. 9 und 10). So wurden die Oxime und Hemisuccinate bzw. Hemiglutarate in undissoziiertem Zustand (niedriger pH des Fließmittels) stärker an der unpolaren Säulenmatrix retentiert als die unmodifizierten Toxine, während sie bei leicht basischem pH des Fließmittels aufgrund der ionisierbaren Gruppe polarere Eigenschaften aufwiesen.

Die Umsetzung von Roridin A und Verrucarin A zu Hemisuccinaten bzw. Hemiglutaraten hatte fast keine Auswirkung auf das Absorptionsverhalten der Derivate (Abb. 13) im Vergleich zu den Spektren der Ausgangssubstanzen (Spektren in COLE und COX, 1984). Für Aflatoxin M₁-Oxim und Aflatoxin B₁-Oxim wurden geringfügige Verschiebungen der Extinktionsmaxima registriert, während die Absorptionsmaxima der Oximderivate von Nivalenol und Fusarenon X (Abb. 12) eine deutliche bathochrome Verschiebung von 220 nach 238 nm zeigten. Das UV-Spektrum von Fusarenon X-Hydrazone ist durch die ausgeprägte Absorptionskurve der Aminobenzoesäure geprägt.

3.2.1.2 Toxin-Protein-Konjugate

3.2.1.2.1 Carbdilimidmethode

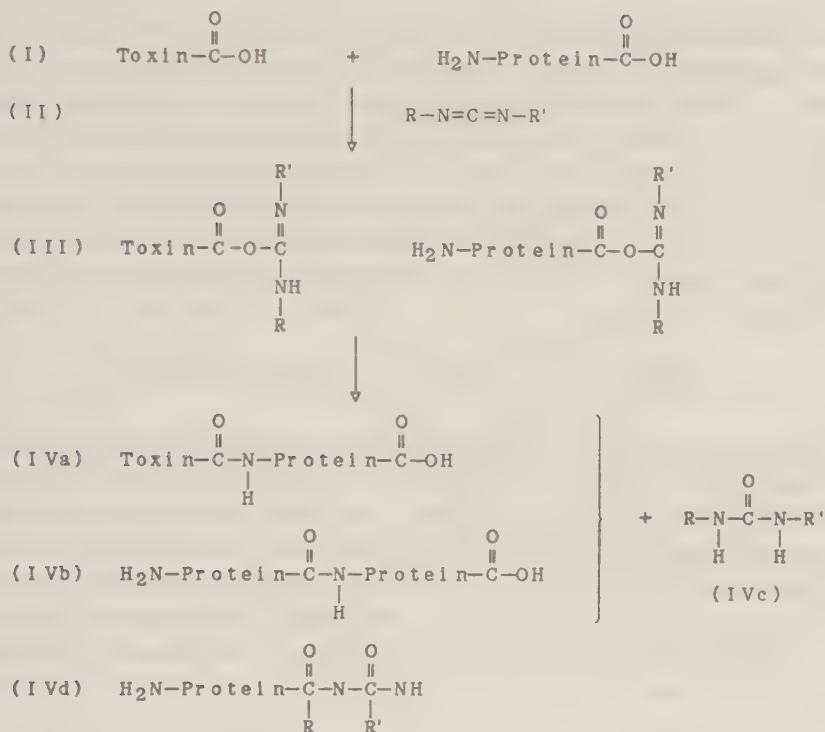


Abbildung 6: Schematischer Reaktionsablauf bei der Carbdilimidmethode

Die Kopplung von Mykotoxinen bzw. deren Derivaten an einen Proteinträger mittels der Carbdilimidmethode (Abb. 6) ist eine einstufige Reaktion, bei der beide Reaktionspartner (I) mit dem im Überschuß zugesetzten Carbdilimid (II) reagieren. Dabei entsteht sowohl am Toxin, wie auch am Protein ein O-Acylisoharnstoff (III), der mit freien Aminogruppen unter Bildung eines Amids und eines Harnstoffderivates (IVc) reagiert. Das Kopplungsprodukt besteht somit zum einen aus dem Toxin-Protein-Konjugat (IVa) und zum anderen aus Protein-Protein-Vernetzungen (IVb), bzw. aus einer Kombination beider Möglichkeiten. Zusätzlich kann es zu einer Nebenreaktion kommen, bei der der O-Acylisoharnstoff nach intramolekularer Umlagerung ein zusätzliches

Epitop am Proteinträger (IVd) bildet. Die Durchführung der Kopplung von Aflatoxin M₁-Oxim an HSA erfolgte nach CHU und UENO (1977):

Zu 1,7 mg Aflatoxin M₁-Oxim in 4 ml eines Ethanol-Wasser-Gemisches (1+4) wurden 250 mg 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid gegeben und 5 min gerührt. Anschließend wurden 2,5 mg Humanserumalbumin (HSA), gelöst in 1,5 ml A. dest., zupipettiert und der Kopplungsansatz 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das pH wurde während der Reaktion mehrmals korrigiert und auf einen Wert von 6 eingestellt. Die Abtrennung des nicht gebundenen Toxins und des überschüssigen Kopplungsreagenzes erfolgte durch Gel-filtration (Sephadex G 50 fine). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

3.2.1.2.2 Gemischte Anhydridmethode

Im Gegensatz zur Carbodiimidmethode stellt die gemischte Anhydridmethode (Abb. 7) eine zweistufige Reaktion dar, bei der im ersten Schritt in wasserfreiem Medium aus dem Toxinderivat (I) und einem Carbonsäurederivat (II) das gemischte Anhydrid (III) entsteht. Die dabei frei werdende Salzsäure wird durch Zugabe einer Base (meist ein tertiäres Amin) neutralisiert. Im zweiten Reaktionsschritt wird das Protein (IV) in einer wässrigen Lösung zugesetzt, wobei mit dem aktivierten Toxin unter Freisetzung von Kohlendioxid ein Amid (V) gebildet wird.

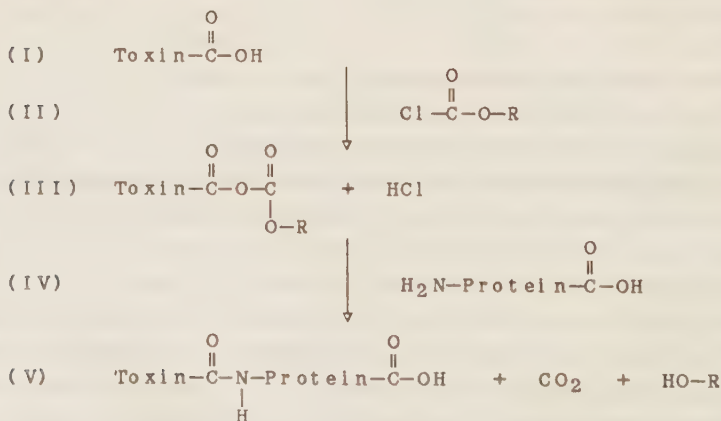


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der gemischten Anhydridreaktion

Mittels der gemischten Anhydridmethode wurde Ochratoxin A an HSA gekoppelt:

5 mg Ochratoxin A wurden in 2 ml Dimethylformamid gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 3 µl Tri-n-butylamin wurde die Mischung auf -15 °C gekühlt, 2 µl Isobutylchlorocarbonat zupipettiert und 5 min gerührt. Dann wurde der Ansatz schnell zu einer Lösung von 7,5 mg HSA in 2 ml A. dest. mit 1,5 ml Dimethylformamid gegeben und für 1 h bei -15 °C inkubiert. Innerhalb von 3 h wurde die Temperatur des Reaktionsgemisches langsam auf 0 °C erhöht. Das pH wurde während der ganzen Reaktion mit 0,1 mol/l NaOH bei 9 gehalten. Anschließend wurden 10 mg NaHCO₃ zugegeben und der Ansatz drei Tage gegen PBS dialysiert.

3.2.1.2.3 Aktive Estermethode

Die aktive Estermethode (Abb. 8) wird ebenfalls in zwei Stufen durchgeführt. Im ersten Schritt entsteht in einem organischen Lösungsmittel mit Hilfe eines Carbodilimids (Dicyclohexylcarbodilimid (DCC)) aus dem Toxinderivat (I) und N-Hydroxysuccinimid (II) ein aktiver Ester (III) als reaktives Zwischenprodukt. Dieser verbindet sich im zweiten Schritt mit den freien ε-Amino- gruppen des in wäßriger Lösung zugesetzten Proteins (IV) unter Ausbildung einer Peptidbindung (V).

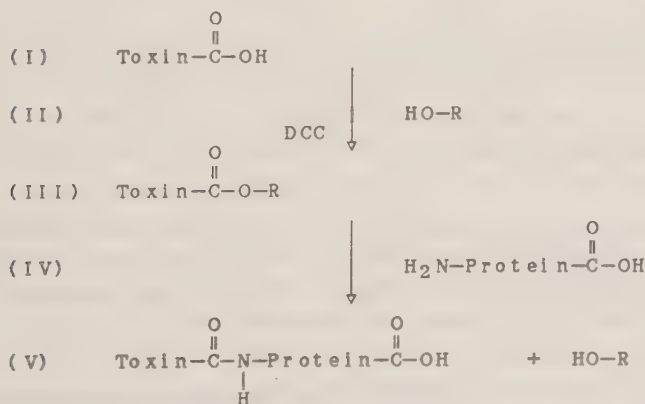


Abbildung 8: Schematischer Reaktionsablauf bei der aktiven Estermethode

Zur Synthese des aktiven Esters wurden die Toxinderivate in Dimethylformamid gelöst und die Reagenzien N-Hydroxysuccinimid und DCC zugegeben. Bei jedem Kopplungsansatz wurde ein molares Verhältnis von 1 : 5 : 10 für Toxinderivat : N-Hydroxysuccinimid : DCC eingehalten. Die eingesetzten Mengen an Toxinderivat sowie die verwendeten Volumina an Dimethylformamid sind in Tab. 12 angegeben. Nach einer Reaktionszeit von 20 h bei 20 °C wurde die Reaktionsmischung ohne weitere Reinigung mit der in Tab. 12 angegebenen Menge HSA (gelöst in 3 ml NaHCO₃; 0,13 mol/l) versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Kopplungsansatz drei Tage gegen PBS dialysiert.

Tabelle 12: Kopplung von Mykotoxinen an HSA mit der aktiven Estermethode

Derivat	Toxin		HSA
	Molekulargewicht	Konzentration (mg/μl DMF)	Menge (mg)
Nivalenol -Oxim	385,1715	2,8/400	10,0
Fusarenon X-Oxim	427,1820	2,1/357	6,8
Roridin A-di-hemisuccinat	732,3889	3,7/400	7,0
Verrucarlin A-hemiglutarat	616,3207	9,5/495	21,0

DMF=Dimethylformamid

3.2.1.2.4 Reduktive Alkylierung

Aldehyde (I) reagieren mit Aminogruppen (II) unter Bildung einer Schiff'schen Base (III). Durch Reduzierung dieser Base mit einem milden Reduktionsmittel wie z.B. Natriumborhydrid (IV) entsteht eine stabile kovalente Verbindung (V) (Abb. 9).

Da Aflatoxin B_{2α} bei pH-Werten über 7,4 als Phenolation mit zwei freien Aldehydgruppen vorliegt (ASHOOR und CHU, 1975), kann dieses Toxin mit der oben beschriebenen Methode einfach an einen Proteinträger gebunden werden.

Dazu wurden in Anlehnung an GAUR et al. (1981) 5 mg Aflatoxin B_{2α} in 1 ml Dimethylformamid gelöst und zu 20 mg HSA (gelöst in 5 ml Phosphatpuffer; 0,05 mol/l, pH 7,5) gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 0,25 ml NaBH₄ (0,13 mol/l) versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden 0,125 ml HCl (0,1 mol/l) zugegeben und das Reaktionsgemisch drei Tage gegen PBS dialysiert.

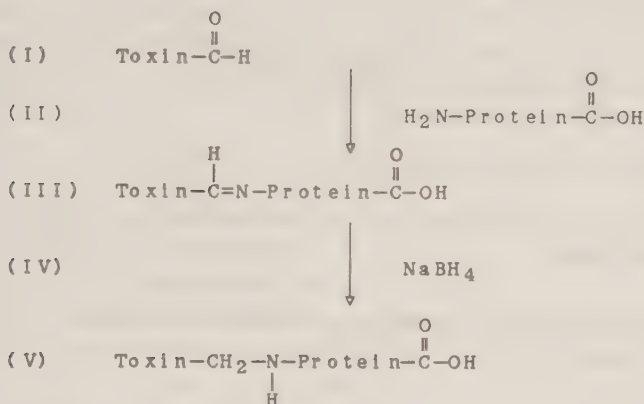


Abbildung 9: Schematischer Reaktionsablauf bei der reduktiven Alkylierung

3.2.1.2.5 Diazotierung

Bei dieser Methode (Abb. 10) wird die primäre aromatische Aminogruppe des Haptens (I) im ersten Schritt durch die aus der Umsetzung von Natriumnitrit (II) mit Salzsäure bei tiefen Temperaturen entstehende salpetrige Säure diazotiert. Das resultierende Diazoniumion (III) kann mit verschiedenen Aminosäureresten des Trägerproteins (IV) reagieren. Es entstehen Azoverbindungen (V).

Die Durchführung der Kopplung erfolgte nach QUARRIE und GALFRE (1985): 1 mg Fusarenon X-Aminobenzoessäurehydrazon wurde in 200 µl HCl (0,1 mol/l mit 20 % Methanol) gelöst und im Eis/Wasser-Bad gekühlt. Dann wurde tropfenweise 2,5%ige Natriumnitritlösung zugegeben, bis freiwerdende salpetrige Säure (HNO₂) mit Kaliumjodidstärkepapier nachgewiesen werden konnte. Dieser Ansatz wurde tropfenweise zu einer Lösung von Keyhole

Limpet Hemocyanin (KLH, 20 mg in 0,1 mol/l Boratpuffer, pH 9,2) gegeben, 5 h im Eis/Wasser-Bad gerührt und anschließend gegen Boratpuffer dialysiert.

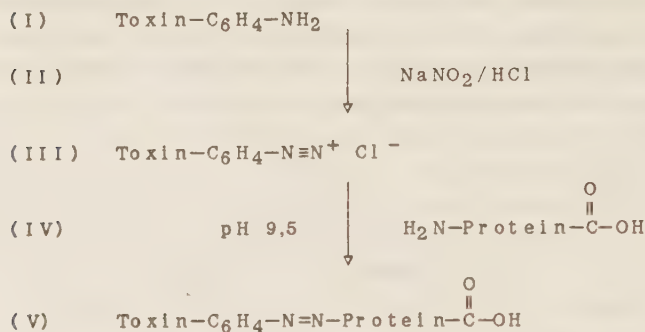


Abbildung 10: Schematischer Reaktionsablauf bei der Kopplung durch Diazotierung

3.2.1.2.6 Charakterisierung der synthetisierten Toxin-Protein-Konjugate mittels HPLC

Voraussetzung für die Berechnung der Kopplungsrate anhand von UV-Spektren ist die vollständige Abtrennung aller nicht kovalent gebundenen Toxinmoleküle vom Kopplungsprodukt. Deshalb wurde zur Überprüfung der Dialyse bzw. der Gelfiltration ein Teil der Toxin-Protein-Konjugate mit HPLC an Proteintrennsäulen analysiert. Dabei werden Substanzen nach ihrem effektiven Durchmesser in Lösungen getrennt, wobei größere Moleküle zuerst eluiert werden. Aufgrund des großen Molekulargewichtsunterschiedes erfolgt an diesen Säulen eine vollständige Trennung des Kopplungsproduktes ($\text{MG} > 68000$) von den nicht gebundenen Toxinderivaten ($\text{MG} < 1000$).

Folgende Analysenbedingungen wurden eingehalten:

Säule: 2 x I-125 Proteintrennsäulen (Waters GmbH, Eschborn;
300 x 7,6 mm)
Eluent: 0,1 mol/l Tris/HCl-Puffer mit 0,1 mol/l Na_2SO_4 , pH 6,5
Fluß: 1,125 ml/min
Detektion: Aufnahme von UV-Spektren (190 - 370 nm) im Abstand von 1sec
mit dem Diodenarraydetektor

3.2.1.2.7 Bestimmung der Kopplungsrate

Der Proteingehalt der Toxin-Protein-Konjugate wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. Dann wurden die Spektren der Konjugate mit dem Spektrum einer aequimolaren Menge HSA verglichen und die Extinktionsdifferenz bei einer für das jeweilige Toxin charakteristischen Wellenlänge ermittelt (Abb. 11-13). Unter denselben Bedingungen wurden für jedes Toxin bzw. Toxinderivat Eichkurven erstellt und die der Extinktionsdifferenz entsprechende Toxinmenge durch Interpolation bestimmt. Die Berechnung der pro Molekül HSA gebundenen Toxinmoleküle erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{C1 \times MG_P}{C2 \times MG_T} = X$$

wobei: C1 = Toxinmenge in mg

C2 = Proteinmenge in mg

MG_P = Molekulargewicht des Proteins (68 000 D für HSA)

MG_T = Molekulargewicht des Toxinderivates (Tab. 12 bzw. 14)

X = Anzahl der Toxinmoleküle pro Molekül Protein

3.2.1.2.8 Ergebnisse

Zur Kopplung der Toxine bzw. der Toxinderivate wurden fünf verschiedene Methoden angewendet. Während mit der Carbodilimid-, der gemischten Anhydrid- und der aktiven Estermethode beliebige Moleküle mit einer Carboxylfunktion an einen Proteinträger mit freien Aminogruppen gebunden werden können, ist die Kopplung von Aflatoxin B_{2α} an HSA durch Reduktion der sich spontan bildenden Schiff'schen Basen keine allgemein anwendbare Methode. Die Bindung an das Protein nach Diazotierung der aromatischen Aminogruppen der Aminobenzoessäurehydrazinderivate von Fusarenon X erfolgt vermutlich bevorzugt über Histidin-, Tyrosin- und - wie in Abb. 16 dargestellt - über Lysinreste des Makromoleküls (FENTON und SINGER, 1971; PINCKART, 1979).

Die Bestimmung der Kopplungsrate erfolgte anhand von UV-Spektren durch Vergleich mit dem unsubstituierten Trägerprotein. Da für diese Methode eine

vollständige Abtrennung aller nicht gebundenen Toxinmoleküle Voraussetzung ist, wurden die Konjugate mittels HPLC überprüft. Nach dreitägiger Dialyse und zweimaligem Wechsel des Puffers konnten mit der HPLC keine niedermolekularen Substanzen mehr nachgewiesen werden. Die Spektren der Toxin-Protein-Konjugate sind in den Abb. 11-13 dargestellt. Für die Aflatoxin M₁- und B_{2α}-HSA-Konjugate sowie für das Ochratoxin A-HSA-Konjugat (Abb. 11) konnte die Anzahl der gebundenen Toxinmoleküle einfach photometrisch bestimmt werden, da diese drei Toxine ausgeprägte Absorptionsmaxima über 300 nm zeigen, ein Wellenlängenbereich, in dem das Trägerprotein keine Eigenabsorption mehr aufweist. Aufgrund der deutlichen Extinktionsdifferenz bei 260 nm zwischen HSA und den Kopplungsprodukten Roridin A- bzw. Verrucaridin A-HSA (Abb. 13) konnte auch für diese beiden Toxin-Protein-Konjugate die Kopplungsrate mit hinreichender Genauigkeit berechnet werden. Die Konjugate von Nivalenol- und Fusarenon-X-Oxim bzw. Fusarenon X-Hydrazon mit HSA und KLH wurden nicht näher charakterisiert, da die Eigenabsorption der Toxinderivate vom Trägerprotein überlagert wurde (Abb. 12) und die spektralen Eigenschaften beider Toxine sich durch die Derivatisierung veränderten.

Die Ergebnisse der Versuche zur Immunogensynthese sind in Tab. 13 zusammengestellt. Die geringste Kopplungsrate wurde mit der Carbodilimidmethode erreicht, während die gemischte Anhydridmethode das am höchsten substituierte Kopplungsprodukt lieferte. Da diese Methode jedoch in der Durchführung am schwierigsten ist, wurde hauptsächlich die aktive Estermethode angewendet, mit der akzeptable Kopplungsraten bei vergleichsweise einfacher Durchführung erreicht werden konnten.

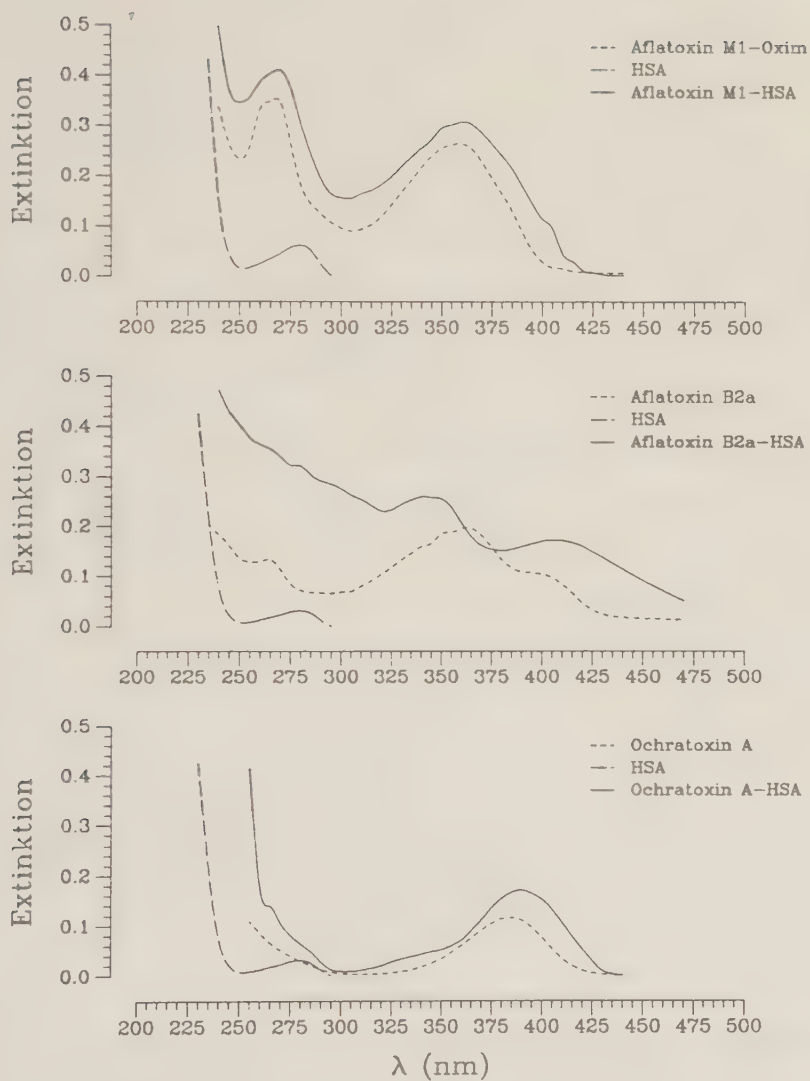


Abbildung 11: UV-Spektren der aus Aflatoxin M₁-Oxim, Aflatoxin B_{2α} bzw. Ochratoxin A und HSA synthetisierten Toxin-Protein-Konjugate und der Ausgangssubstanzen

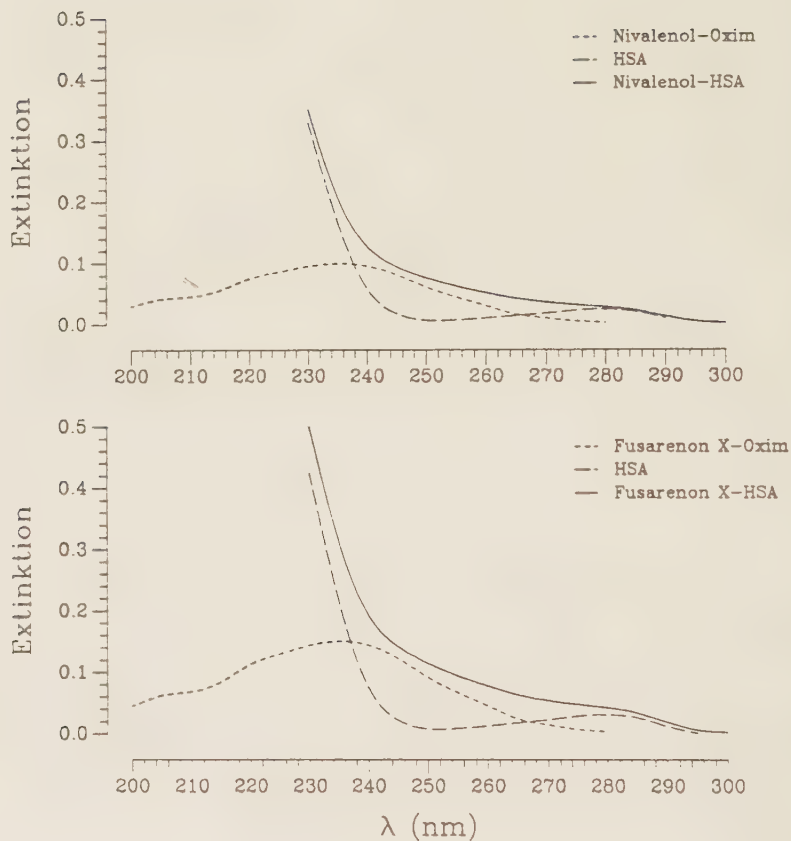


Abbildung 12: UV-Spektren der aus Nivalenol- bzw. Fusarenon X-Oxim und HSA synthetisierten Toxin-Protein-Konjugate. Zum Vergleich sind jeweils die reinen Toxinderivat- und HSA-Spektren mit eingezeichnet.

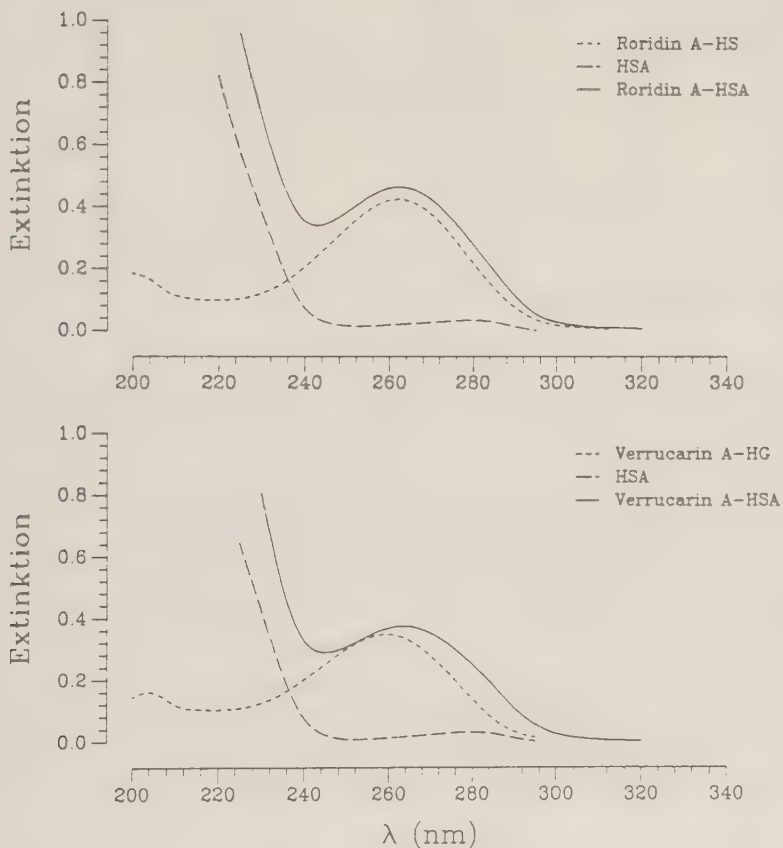


Abbildung 13: UV-Spektren der aus Roridin A-Dihemisuccinat bzw. Verrucarin A-Hemiglutarat und HSA synthetisierten Toxin-Protein-Konjugate. Zum Vergleich sind jeweils die reinen Toxin-derivat- und HSA-Spektren mit eingezeichnet.

Tabelle 13: Versuche zur Kopplung von Mykotoxinen an HSA (Kopplungs-
methode, Kopplungsansatz und Kopplungsrate)

Toxin-	Derivat	Kopplungsmethode	mol Toxin : mol Protein	
			eingesetzt	gebunden
Aflatoxin M ₁ -	Oxim	Carbodiimid	60 : 1	4 : 1
Aflatoxin B ₁ -	Hemiacetal	reduktive Alkylierung	50 : 1	11 : 1
Ochratoxin A		gemischte Anhydrid	88 : 1	28 : 1
Nivalenol-	Oxim	aktive Ester	50 : 1	-a)
Fusarenon X-	Oxim	aktive Ester	50 : 1	-a)
Roridin A-	Hemisuccinat	aktive Ester	50 : 1	18 : 1
Verrucarín A-	Hemiglutarat	aktive Ester	50 : 1	15 : 1

a) Kopplungsrate nicht bestimmt

Durch die verwendeten Derivatisierungsreagenzien, die als Brücken ("Spacer") wirken, resultieren unterschiedliche Abstände zum Proteinträger. Während Aflatoxin B_{2α} und Ochratoxin A direkt gekoppelt wurden und somit kaum Abstand zum Träger haben (Abb. 14 und 15), besitzen Verrucarín A und Roridin A durch die Hemiglutarat- bzw. Hemisuccinatbrücke eine Distanz von 5 bzw. 4 C-Atomen zum Protein (Abb. 17). Da Roridin A zu einem Dihemisuccinat umgesetzt wurde, kann das Toxinderivat wie in Abb. 17 angedeutet an zwei verschiedenen Stellen an den Proteinträger gebunden sein. Die Oxim-Derivate von Aflatoxin M₁, Nivalenol und Fusarenon X (Abb. 14 und 16) besitzen einen mittleren Abstand von etwa 3 C-Atomen zum Trägerprotein, während Fusarenon X-Hydrazon (Abb. 16) eine deutlich größere Distanz zum Makromolekül aufweist.

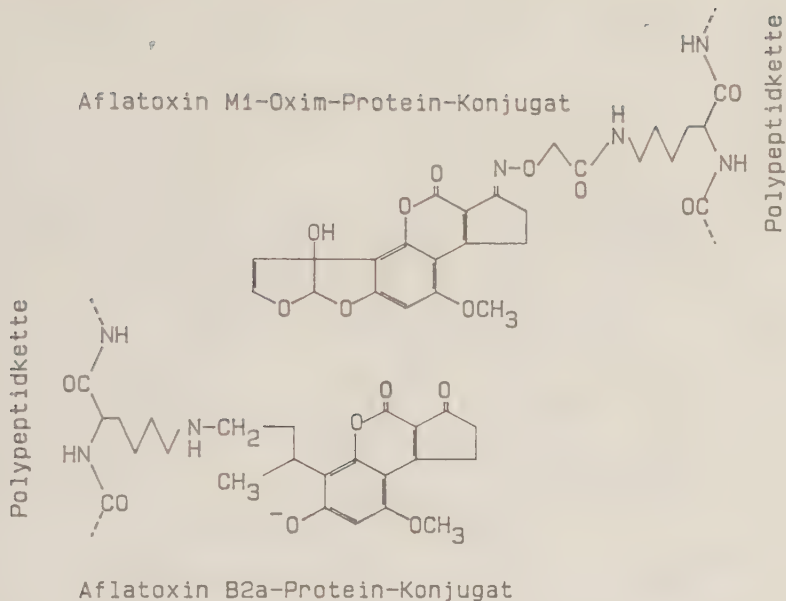


Abbildung 14: Schematische Darstellung des an das Trägerprotein gebundenen Aflatoxin M₁-Oxim. Das Phenolatation des Aflatoxin B_{2a} wurde durch reduktive Alkylierung direkt gekoppelt.

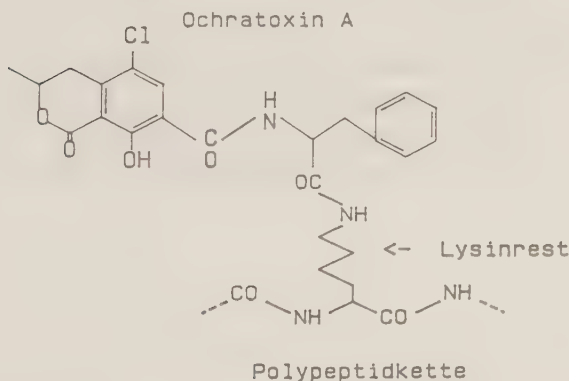


Abbildung 15: Schematische Darstellung des an das Trägerprotein gebundenen Ochratoxin A

Nivalenol : R = OH
 Fusarenon X: R = OCOCH₃

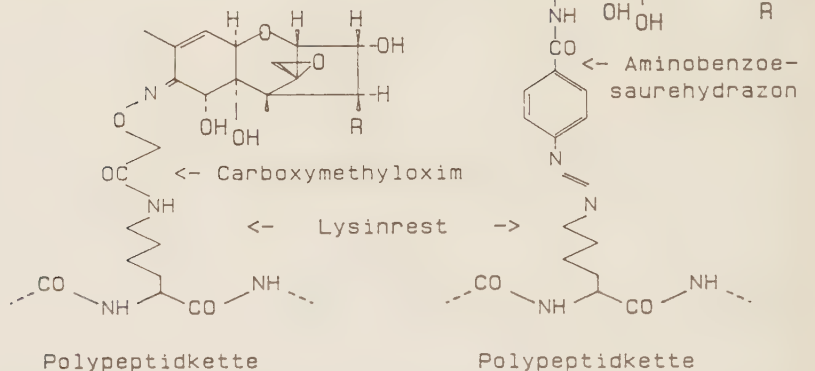


Abbildung 16: Schematische Darstellung der über eine Carboxymethyloximbrücke an das Trägerprotein gebundenen Ketotrichothecene Nivalenol und Fusarenon X. Zur Durchführung des indirekten Enzymimmuntests wurde Fusarenon X über eine Aminobenzoesäurehydrazonbrücke an Keyhole Limpet Hämocyanin als Trägerprotein gekoppelt. Bei der Kopplung durch Diazotierung (3.2.1.2.5) kann das Toxinderivat auch an andere Aminosäuren als an das hier dargestellte Lysin gebunden werden.

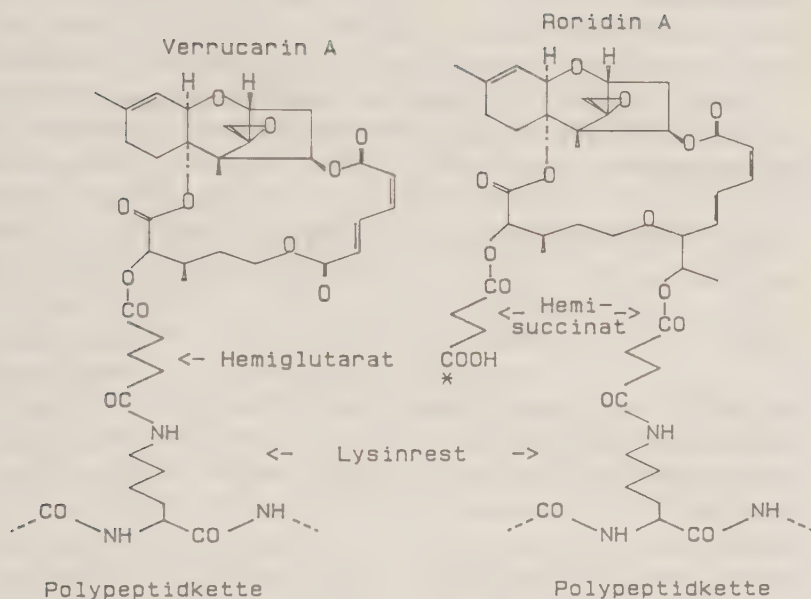


Abbildung 17: Schematische Darstellung der über eine Hemiglutarat- bzw. Hemisuccinatbrücke an das Trägerprotein gebundenen makrozyklischen Trichothecene Verrucaric A und Roridin A. Die zweite für Roridin A mögliche Kopplungsstelle ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3.2.1.3 Toxin-Enzym-Konjugate

3.2.1.3.1 Kopplung

Zur Herstellung enzymmarkierter Toxine für den direkten kompetitiven Enzymimmunotest wurden die in 3.2.1.1 beschriebenen Toxinderivate an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Außer für das Aflatoxin B_{2α} wurde dazu die aktive Estermethode verwendet. Die Durchführung der Kopplungsreaktion erfolgte wie in 3.2.1.2.3 beschrieben. Die eingesetzten Mengen an Toxinderivat und Meerrettichperoxidase (HRP) sowie die verwendeten Volumina an Dimethylformamid und NaHCO₃-Lösung (0,13 mol/l) sind in Tab. 14 angegeben.

Tabelle 14: Kopplung von Mykotoxinen an HRP mit der Aktiven Estermethode

Derivat	Toxin		HRP
	Molekulargewicht	Konzentration (mg/μl DMF)	Konzentration (mg/ml NaHCO ₃)
Aflatoxin M ₁ -Oxim	401,1094	0,4 / 100	4,0 / 3,0
Aflatoxin B ₁ -Oxim	385,1145	1,5 / 375	15,5 / 3,0
Ochratoxin A	403,0822	1,3 / 130	20,0 / 3,0
Nivalenol-Oxim	385,1715	0,7 / 100	7,2 / 1,5
Fusarenon X-Oxim	427,1820	0,8 / 142	8,0 / 1,5
Roridin A-	732,3889	0,7 / 100	5,3 / 1,5
Di-hemisuccinat			
Verrucaridin A-	616,3207	3,0 / 155	20,0 / 2,0
Hemiglutarat			

DMF = Dimethylformamid; NaHCO₃ = Natriumbicarbonatlösung (0,13 mol/l)

Aflatoxin B_{2α} wurde, wie in 3.2.1.5.4 beschrieben, mittels reduktiver Alkylierung an HRP gebunden. Dazu wurden 5 μg Aflatoxin B_{2α} in 100 μl Dimethylformamid gelöst und zu 2 mg HRP (gelöst in 2 ml Phosphatpuffer; 0,05 mol/l, pH 7,5) gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 0,25 ml NaBH₄ (0,13 mol/l) versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden 0,125 ml HCl (0,1 mol/l) zugegeben und das Reaktionsgemisch drei Tage gegen PBS dialysiert. Aflatoxin M₁-Oxim wurde daneben auch mit der Carbodiimidmethode (3.2.1.2.1) an HRP gekoppelt:

0,8 mg Aflatoxin M₁-Oxim wurden in 6 ml eines Ethanol-Wasser-Gemisches (1 + 3) gelöst und mit 200 mg 1-Ethyl-3-(3-Di-methylaminopropyl-) carbodilimid versetzt. Dann wurden 4,6 mg HRP (gelöst in 2 ml 25%igem Ethanol) zugegeben, der Ansatz 16 h bei 4 °C gerührt und anschließend gegen PBS dialysiert.

3.2.1.3.2 Charakterisierung

Der Peroxidasegehalt der dialysierten Toxin-HRP-Konjugate wurde photometrisch anhand einer Eichkurve für Peroxidase (Messung bei 403 nm; Bereich: 100–1000 µg/ml) berechnet und die katalytische Aktivität im Vergleich zu unbehandelter Peroxidase durch Messung der Enzymkinetik in Pyrogallolsubstratlösung (3.1.3) bei 20 °C bestimmt.

3.2.1.3.3 Ergebnisse

Die zur Kopplung von Mykotoxinderivaten an HRP angewandten Methoden und die Verhältnisse der dabei eingesetzten molaren Stoffmengen, sowie die im Vergleich zu unbehandelter Peroxidase ermittelte Restenzymaktivitäten können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 15: Versuche zur Kopplung von Mykotoxinen an HRP

Toxin-	Derivat	Kopplungsmethode	molares Verhältnis ^{a)}	HRP-Rest- aktivität (%)
Aflatoxin M ₁ -	Oxim	Carbodilimid	17 : 1	35,0
Aflatoxin M ₁ -	Oxim	Aktive Ester	10 : 1	56,5
Aflatoxin B ₁ -	Oxim	Aktive Ester	10 : 1	76,0
Aflatoxin B ₁ -	Hemiacetal	red. Alkylierung	0,3 : 1	54,5
Ochratoxin A		Aktive Ester	10 : 1	58,5
Nivalenol-	Oxim	Aktive Ester	10 : 1	59,0
Fusarenon X-	Oxim	Aktive Ester	10 : 1	66,0
Roridin A-	Hemisuccinat	Aktive Ester	10 : 1	61,5
Verrucarín A-	Hemiglutarat	Aktive Ester	10 : 1	85,5

a) zur Kopplung eingesetztes Verhältnis von Toxinderivat zu Peroxidase

3.2.1.4 Anti-Kaninchen-IgG (Schaf)

Als Festkörperphase zur Durchführung der Titerbestimmung (3.2.1.5.2) und der simultanen Enzymimmuntests (3.2.2) wurde gegen Kaninchen IgG gerichtetes Antiserum vom Schaf verwendet. Nach MEYER (1986) ist die Verwendung von affinitätschromatographisch gereinigtem Antiserum nötig, um eine genügende Bindungskapazität der Festkörperphase zu erreichen.

3.2.1.4.1 Kopplung von Kaninchen IgG an Sepharose

1 g Cyanogen Bromide Activated Sepharose 6 MB (Sigma Chemie GmbH Nr. C-9267) wird nach Vorschrift des Herstellers vorbehandelt. Dann werden 10 mg Kaninchen IgG in 5 ml 0,1 mol/l NaHCO_3 (mit 0,5 mol/l NaCl-Zusatz) gelöst und zu dem vorbehandelten Gel gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur wird das Gel abwechselnd mit Acetatpuffer (0,1 mol/l, pH 4,0 mit 0,5 mol/l NaCl-Zusatz) und Boratpuffer (0,1 mol/l, pH 8,0 mit 0,5 mol/l NaCl-Zusatz) gewaschen. Nicht belegte reaktive Gruppen werden durch Zugabe einer 0,1 molaren Ethanolaminlösung geblockt. Anschließend wird das Gel mit A. dest. gewaschen, in Phosphatpuffer (0,01 mol/l, pH 7,2) mit 0,01 % Natriumazidzusatz suspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.1.4.2 Affinitätschromatographie

Die affinitätschromatographische Reinigung des Antiserums gegen Kaninchen IgG wurde im Batch-Verfahren durchgeführt:

3 ml Schafserum wurden nach der Methode von HEBERT et al. (1973) mit Ammoniumsulfat gefällt, mit dem vorbereiteten Gel (3.2.1.4.1) gemischt und 18 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gel abzentrifugiert, mit A. dest. gewaschen, in Glycinpuffer (0,1 mol/l, pH 2,5) resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Gel erneut abzentrifugiert und der Überstand mit dem gereinigten Anti-Kaninchen IgG sofort mit konzentrierter Tris-(Hydroxymethyl-) Aminomethanolösung auf pH 8 eingestellt. Dieser Vorgang wurde nach Bedarf mehrmals wiederholt. Die gewonnenen Antikörperfraktionen wurden gepoolt und der Proteingehalt nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt.

3.2.1.4.3 Ergebnisse

Die Bindungskapazität der eigenen Antiserumpräparation war im Vergleich zu dem als Standard verwendeten, ebenfalls affinitätschromatographischen gereinigten Produkt der Fa. Sigma (Nr. R 4880) bei gleichem Proteingehalt in allen Enzymimmunoassays um 5-10 Prozent höher. Mit dem lediglich durch Ammoniumsulfatfällung gereinigten Antiserum konnte dagegen nur 1/10 der Bindungskapazität des Standardserums erreicht werden.

3.2.1.5 Gewinnung spezifischer Antitoxinseren

3.2.1.5.1 Immunisierung

Mit den in 3.2.1.2 beschriebenen Mykotoxin-HSA-Konjugaten wurden Kaninchen nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1974) immunisiert. Die Immunogene wurden in sterilem A. dest. gelöst und mit drei Volumenteilen komplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert. Zur Grundimmunisierung wurde jedem Tier eine Proteinmenge von 200-300 µg (Tab. 16) in 2 ml Emulsion an 20-30 Stellen am Rücken intracutan (i.c.) appliziert. Die Restimulierungen erfolgten nach den in Tab. 16 angegebenen Zeiten mit den angegebenen Mengen an Immunogen. Die Toxin-Protein-Konjugate wurden dazu ebenfalls mit drei Teilen komplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert und subcutan (s.c.) oder intramuskulär (i.m.) verabreicht.

Tabelle 16: Immunisierungsschemata

Immunogen	Grundimmunisierung		Restimulierung			Versuchs- dauer (Wo)
	Appl.- Modus	Menge (µg/Tier)	Appl.- Modus	Menge (µg/Tier)	Zeit (Wo)	
Aflatoxin M ₁ - Oxim-HSA	i.c.	250	i.m.	220	10	25
Aflatoxin B ₂ α- HSA	i.c.	300	s.c.	300	15	55
			s.c.	200	48	
Ochratoxin A- HSA	i.c.	300	i.m.	250	9	21
Nivalenol- Oxim-HSA	i.c.	200	i.m.	250	14	52
			s.c.	250	22	
			s.c.	500	31	
			s.c.	500	40	
Fusarenon X- Oxim-HSA	i.c.	225	s.c.	225	15	54
			s.c.	200	48	
Roridin A-Di- Hemisuccinat-HSA	i.c.	250	i.m.	250	14	37
Verrucarín A- Hemiglutarat-HSA	i.c.	300	s.c.	300	23	63
			s.c.	200	55	

3.2.1.5.2 Immunisierungsverlauf

Zur Kontrolle des Immunisierungsverlaufs wurde beginnend mit der zweiten Woche nach der Grundimmunisierung in Intervallen von 1-3 Wochen den Tieren aus der *A. auricularis rostralis* Blut entnommen, das Serum gewonnen und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Titerbestimmung wurde eine modifizierte „Double Antibody Solid Phase“-Technik (DASP) verwendet (ARAKAWA et al., 1981). Der schematische Ablauf dieser Methode ist in Abb. 18 dargestellt.

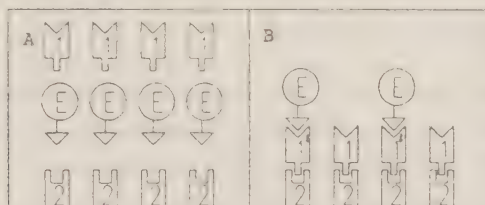


Abbildung 18: Bestimmung spezifischer Antiserumtiter:

A: In eine Mikrotiterplatte, die mit Antikörper (2), der gegen Kaninchen IgG gerichtet ist, beschichtet ist, wird das zu testende Serum in verschiedenen Verdünnungsstufen und das enzymmarkierte Toxin (∇ -E) pipettiert.

B: Die IgG-Moleküle (1) des Serums werden von dem Antilimmunglobulin gebunden, wobei die spezifischen Anti-Toxin-Antikörper (1') gleichzeitig das enzymmarkierte Toxin (∇ -E) binden.

Nach ausreichender Inkubation kann die gebundene Enzymmenge anhand des Substratumsatzes gemessen werden.

Mikrotiterplatten wurden mit affinitätschromatographisch gereinigtem Anti-Kaninchen-IgG-Serum (vom Schaf) in einer Konzentration von $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ in Bicarbonatpuffer beschichtet ($100\text{ }\mu\text{l/Kavität}$; Inkubation 24 h bei Raumtemperatur), ausgeschlagen und mit 3 % FKS in PBS ($150\text{ }\mu\text{l/Kavität}$) 20 min abgesättigt. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und ausgeschlagen. Von dem entsprechenden Toxin-Enzym-Konjugat

(3.2.1.3) wurden 50 μ l/Kavität (Verdünnung in PBS/1% FKS: Aflatoxin M₁-HRP 1:10000; Aflatoxin B₂ α -HRP 1:500; Ochratoxin A-HRP 1:10000; Nivalenol-HRP 1:500; Fusarenon X-HRP 1:500; Roridin A-HRP 1:150000; Verrucaridin A-HRP 1:50000) und von den zu testenden Antiserumverdünnungsreihen ebenfalls 50 μ l/Kavität zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut gewaschen. Anschließend wurde Substratlösung (3.1.3, 100 μ l/Kavität) zugegeben, nach 15 min die Enzymreaktion mit Schwefelsäure (1 mol/l; 100 μ l/Kavität) gestoppt und die Farbintensität bei 450 nm gemessen. Als Titer wurde die Serumverdünnung definiert, die unter diesen Reaktionsbedingungen einen Extinktionswert von 0,3 Einheiten ergab.

3.2.1.5.3 Aufbereitung der Antisera

Zur direkten Beschichtung von Mikrotiterplatten für den konsekutiven Enzymimmunotest wurden die Antisera nach der Methode von HEBERT et al. (1973) dreimal mit Ammoniumsulfat gefällt, lyophilisiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Durchführung der Enzymimmunotests mit Anti-Kaninchen-IgG (3.2.1.4) als Festkörperphase wurden die Rohsera bei -80 °C gelagert und ohne weitere Reinigung verwendet.

3.2.1.5.4 Ergebnisse

Die Verwendung eines Antimunglobulins als Festkörperphase in Kombination mit dem entsprechenden enzymmarkierten Toxin erlaubt eine Aussage über den relativen Gehalt des untersuchten Serums an spezifischen antigenbindenden IgG-Molekülen. Da bei diesem Verfahren neben den gegen das Mykotoxin gerichteten Antikörpern auch alle anderen Immunglobuline der Klasse G an die Festkörperphase gebunden werden, ergibt sich der in Abb. 19 dargestellte Kurvenverlauf. Bei hohem Antikörpergehalt (niedrige Serumverdünnung) wird die IgG-Bindungskapazität der Festkörperphase überschritten, so daß nur ein proportionaler Anteil der Immunglobuline und damit auch weniger Toxin-Enzym-Konjugat gebunden wird. Ab einer genügend hohen Serumverdünnung (Kurvenmaximum in Abb. 19) können alle IgG-Moleküle gebunden werden und der weitere Verlauf der Titrationskurven zeigt die erwartete Abnahme in Abhängigkeit von der Antiserumverdünnung. Als End-

punkt-titer zum Vergleich der Seren verschiedener Immunisierungsstadien bzw. verschiedener Tiere wurde die maximale Serumverdünnung festgelegt, die eine Extinktion von 0,3 Einheiten ergab. Die als Kontrolle ebenfalls getesteten Seren vor der Immunisierung ergaben einen Extinktionswert von maximal 0,03 Einheiten.

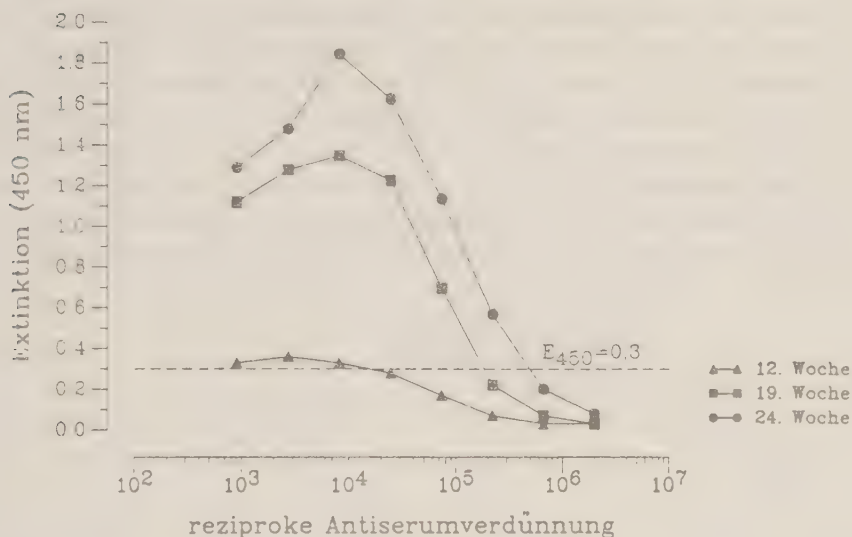


Abbildung 19: Titrationskurven von Antiseren gegen Fusarenon X 12, 19 und 24 Wochen nach der Grundimmunisierung. Als Titer wurde die Serumverdünnung festgelegt, die unter definierten Bedingungen einen Extinktionswert von 0,3 ergab.

Wie die Abbildungen 20-23 zeigen, konnte mit den in komplettem Freund'schem Adjuvans emulgierten Toxin-HSA-Konjugaten nach intracutaner Applikation eine spezifische Immunantwort induziert werden. Die ersten Anti-Toxin-Antikörper wurden 4-6 Wochen nach der Grundimmunisierung nachgewiesen. Durch eine Restimulation zwischen der 9. und 15. Woche konnte bei etwa 50 % der Versuchstiere eine deutliche sekundäre Immunantwort hervorgerufen werden. Bei den gegen Aflatoxin B₂α (Abb. 21), Fusarenon X (Abb. 22) bzw. Verrucarín A (Abb. 23) immunisierten Kaninchen wurde durch eine dritte Immunogenapplikation in der 48. bzw. 55. Woche eine

weitere Steigerung der inzwischen abgesunkenen Antikörperspiegel erreicht. Während der Immunisierung gegen Nivalenol (Abb. 22) konnte dagegen nach der zweiten Restimulierung in der 22. Woche auch durch weitere Immunogenapplikationen ein Absinken der Antikörpertiter nicht verhindert werden. Neben dem individuell verschiedenen Antikörperbildungsvermögen der Kaninchen innerhalb der Gruppen, denen dasselbe Immunogen appliziert wurde, zeigten sich auch Unterschiede in der Immunogenität der verwendeten Toxin-HSA-Konjugate (3.2.1.2). So induzierten die Aflatoxin M₁-, Roridin A- und Verrucaridin A- HSA-Konjugate nach der ersten Restimulierung über einige Wochen gleichbleibend hohe Titer spezifischer Anti-Toxin-Antikörper. Auch die aus Aflatoxin B₂, Ochratoxin A und Fusarenon X mit HSA synthetisierten Immunogene zeigten gute antigene Wirksamkeit. Mit dem Nivalenol-HSA-Konjugat dagegen konnte erst nach der zweiten Restimulierung in einem von drei Kaninchen kurzzeitig ein höherer Antikörperspiegel erreicht werden.

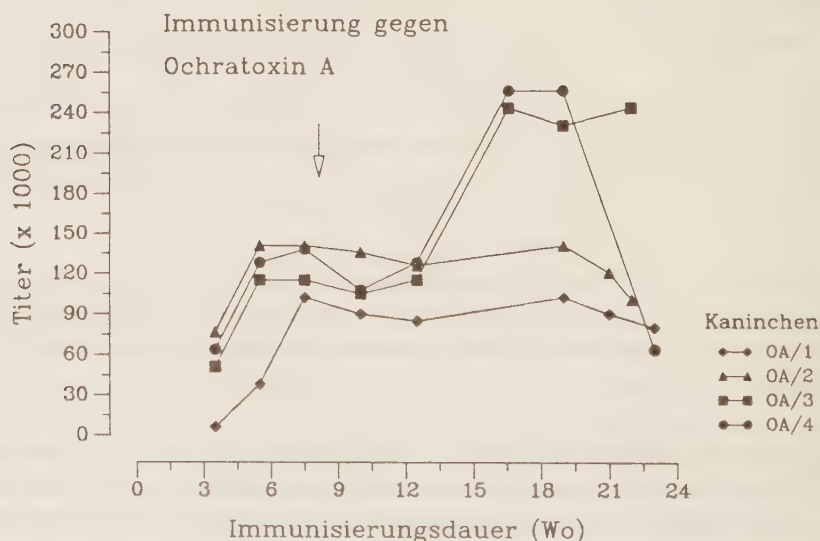


Abbildung 20: Serومتiter der gegen Ochratoxin A immunisierten Kaninchen. Der Zeitpunkt der Restimulierung ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

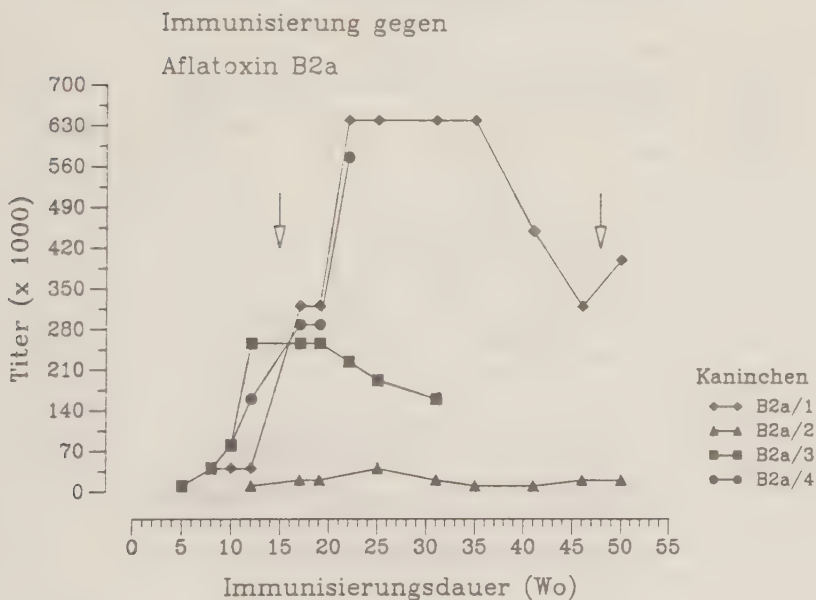
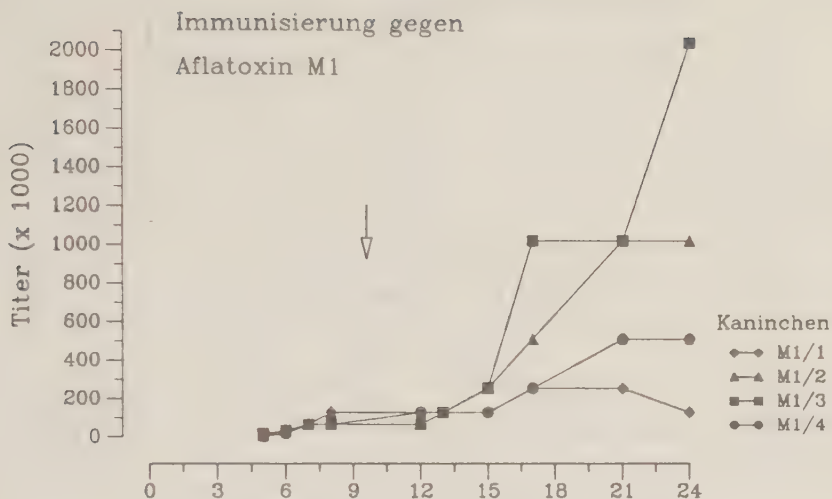


Abbildung 21: Seruntiter der gegen Aflatoxin M₁ bzw. B_{2a} immunisierten Kaninchen. Der Zeitpunkt der Restimulierungen ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

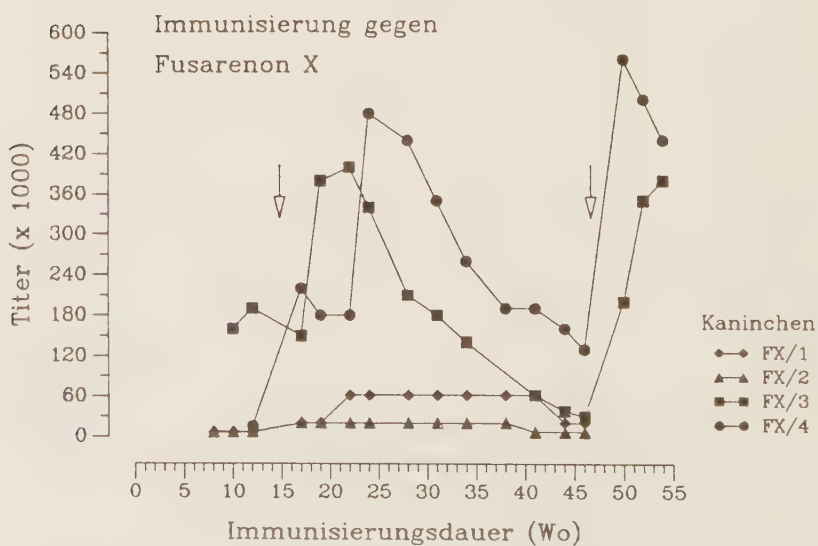
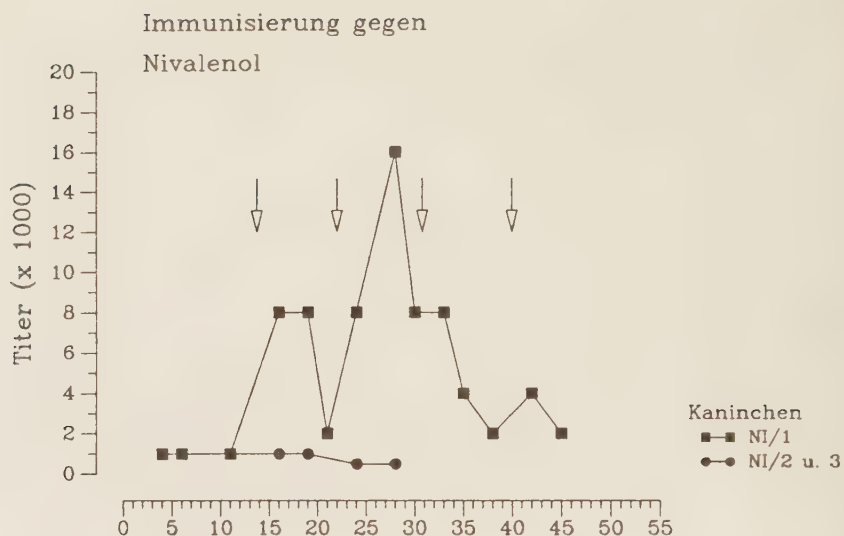


Abbildung 22: Serumtiter der gegen Nivalenol bzw. Fusarenon X immunisierten Kaninchen. Der Zeitpunkt der Restimulationen ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

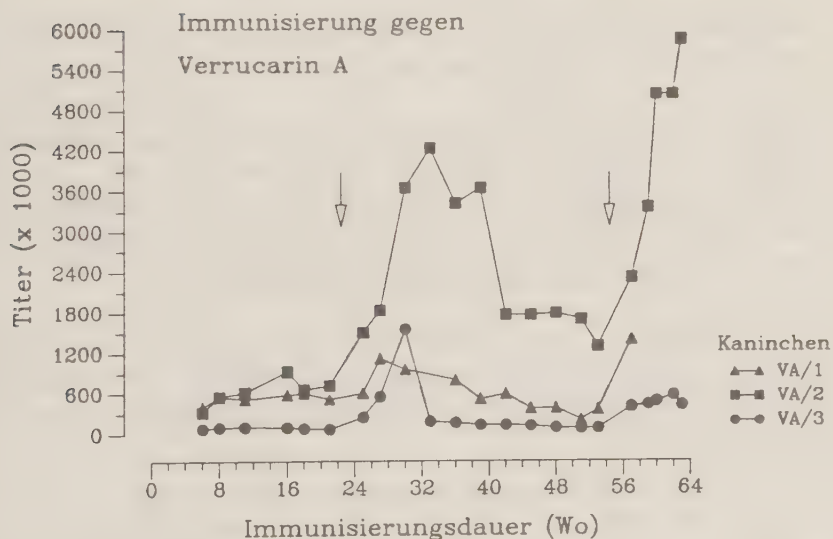
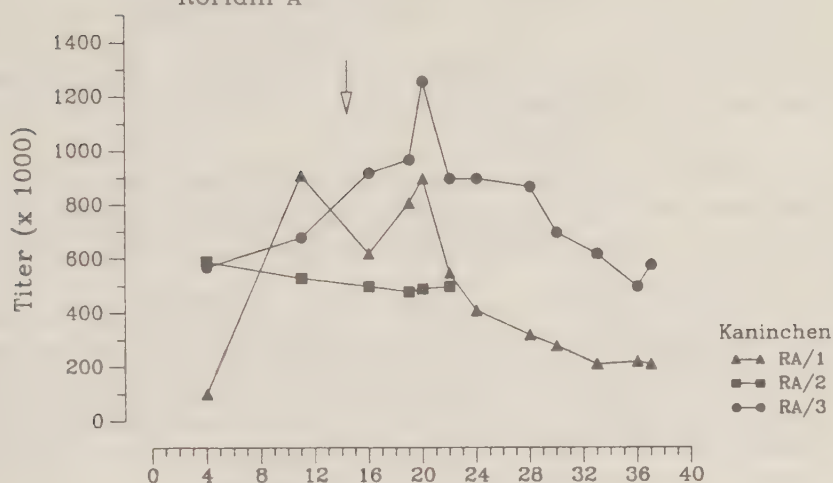


Abbildung 23: Seruntiter der gegen Roridin A bzw. Verrucarin A immunisierten Kaninchen. Der Zeitpunkt der Restimulierungen ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.2.2 Enzymimmunoologische Nachweisverfahren

3.2.2.1 Prinzip und Definition der verwendeten Bezeichnungen

Zur Durchführung der Enzymimmunotests wurden zwei kompetitive Methoden, eine direkte und eine indirekte, verwendet.

Beim direkten kompetitiven Test (Abb. 24) konkurrieren freies und enzymmarkiertes Toxin um eine begrenzte Anzahl Antikörperbindungsstellen. Die Menge an gebundenem enzymmarkiertem Toxin kann direkt bestimmt werden.

Beim indirekten kompetitiven Test (Abb. 25) bildet das Toxin (in der Regel als Toxin-Protein-Konjugat) die Festkörperphase und konkurriert ebenfalls mit dem freien Toxin um die Antikörperbindungsstellen. Die Anzahl der von Antikörpern belegten Toxinmoleküle an der Festkörperphase kann jedoch nur indirekt über den Nachweis der gebundenen Antikörper durch ein tierart-spezifisches, enzymmarkiertes Antilmmunglobulin erfolgen.

Beide Methoden sind heterogene Verfahren, d.h., nach den spezifischen Bindungsschritten werden nicht gebundene Reagenzien entfernt.

Entsprechend der zeitlichen Anordnung der Inkubationsschritte kann außerdem bei dem direkten Test zwischen einem konsekutiven und einem simultanen Verfahren unterschieden werden. Dabei werden freies und enzymmarkiertes Toxin entweder nacheinander (konsekutiv) bzw. gleichzeitig (simultan) mit dem an die Festkörperphase adsorbierten Antiserum inkubiert.

Zur Standardisierung und Vereinfachung wurde das direkte simultane Verfahren in einem System mit einem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG) als Festkörperphase ("Double Antibody Solid Phase" (DASP)) durchgeführt (Abb. 26).

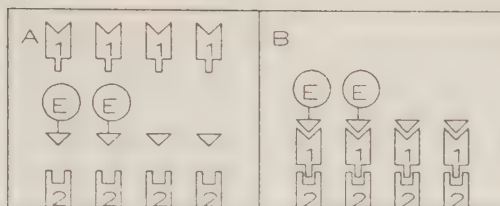


Abbildung 24: Direkt kompetitiver Enzymimmunitest:

A: In eine Mikrotiterplatte, die mit Anti-Toxin-Serum (1) beschichtet ist, wird freies (v) und enzymmarkiertes (v-E) Toxin pipettiert.

B: Ein der zugegebenen Menge proportionaler Anteil des freien und des enzymmarkierten Toxins wird gebunden. Der Substratumsatz des gebundenen Enzyms ist umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Toxins.

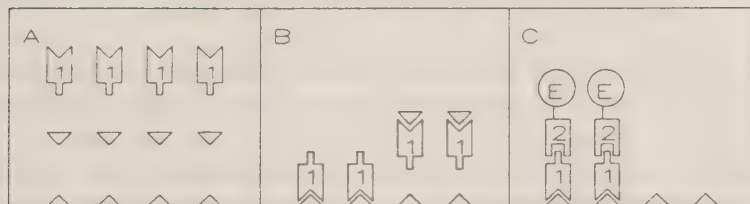


Abbildung 25: Indirekt kompetitiver Enzymimmunitest:

A: In eine Mikrotiterplatte, die mit Toxin-Protein-Konjugat (Δ) beschichtet ist, wird freies Toxin (v) und Anti-Toxin-Serum (1) pipettiert.

B: Ein Teil des zugegebenen Anti-Toxin-Serums bindet das freie Toxin, während sich der Rest an das adsorbierte Toxin-Protein-Konjugat bindet.

C: Die Menge des an das Toxin-Protein-Konjugat gebundenen Anti-Toxin-Serums kann durch die Zugabe von enzymmarkiertem Anti-Immunglobulin (2-E) bestimmt werden. Der Substratumsatz des gebundenen Enzyms ist umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Toxins.



Abbildung 26: Direkt kompetitiver Enzymimmunotest mit einem zweiten Antikörper als Festkörperphase:

A: In eine Mikrotiterplatte, die mit Anti-Immunglobulin (2) beschichtet ist, wird freies (v) und enzymmarkiertes (v-E) Toxin und Anti-Toxin-Serum (1) pipettiert.

B: Das Anti-Toxin-Serum wird von dem Anti-Immunglobulin gebunden, wobei die spezifischen Anti-Toxin-Antikörper gleichzeitig proportionale Anteile des freien und des enzymmarkierten Toxins binden. Der Substratumsatz des gebundenen Enzyms ist umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Toxins.

Bei allen Verfahren muß zusätzlich zwischen homologer und heterologer Kombination von Anti-Toxin-Serum und Toxin-Enzym-Konjugat unterschieden werden:

Bei homologer Kombination wird zur Immunogensynthese und für die Herstellung des enzymmarkierten Toxins das gleiche Toxinderivat benutzt, d.h. die antigene Determinante am Immunogen und am Enzym ist identisch (siehe auch Abb. 14-17). Beim heterologen Verfahren wird dagegen zur Enzymkonjugatsynthese ein anderes Toxin (heterologes Toxin), ein anderes Derivatisierungsreagenz (heterologe Brücke) oder eine andere Position am Molekül (heterologe Seite) zur Kopplung verwendet, wobei Kombinationen möglich sind.

3.2.2.2 Durchführung

3.2.2.2.1 Beschichten der Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten wurden mit Antiserum (Anti-Toxin-Serum bzw. Anti-Kaninchen-IgG)- bzw. Toxin-Protein-Konjugat-Verdünnungen in Bicarbonatpuffer beschichtet (Abb. 27a-c, A). Zur Blockierung freier Bindungsstellen der Polystyrolplatten wurde eine 3%ige FKS-Lösung in PBS zugegeben. Anschließend wurden alle nicht gebundenen Reagenzien durch einen Waschschrift entfernt (Abb. 27a-c, B).

3.2.2.2.2 Spezifische Immunreaktion

Bei der konsekutiven Testanordnung werden nacheinander Toxin-Lösung und Toxin-Enzym-Konjugat zugegeben und jeweils 1 h mit dem Immunosorbens (Anti-Toxin-Serum) inkubiert (Abb. 27a, C).

Im simultanen Test erfolgt dagegen die gleichzeitige Inkubation von Toxin-Lösung, Toxin-Enzym-Konjugat und Anti-Toxin-Serum in mit Anti-Kaninchen-IgG-Serum beschichteten Platten (Abb. 27b, C).

Beim indirekten Verfahren werden Toxin-Lösung und spezifisches Antiserum ebenfalls gleichzeitig in den mit Toxin-Protein-Konjugat beschichteten Platten (Abb. 27c, C1) inkubiert und diese anschließend gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Anti-Toxin-Antikörper wurde Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat zupipettiert (Abb. 27c, C2).

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden alle nicht gebundenen Reagenzien durch einen Waschschrift entfernt.

3.2.2.2.3 Farbreaktion

Zur Bestimmung der gebundenen Enzymmenge wurde in jede Kavität Substratlösung pipettiert und 10-20 min inkubiert (Abb. 27a-c, D). Durch Zugabe von Schwefelsäure wurde die Enzymtätigkeit gestoppt und der Endpunkt der Reaktion durch Messung der Extinktion bei 450 nm bestimmt (Abb. 27a-c, E).

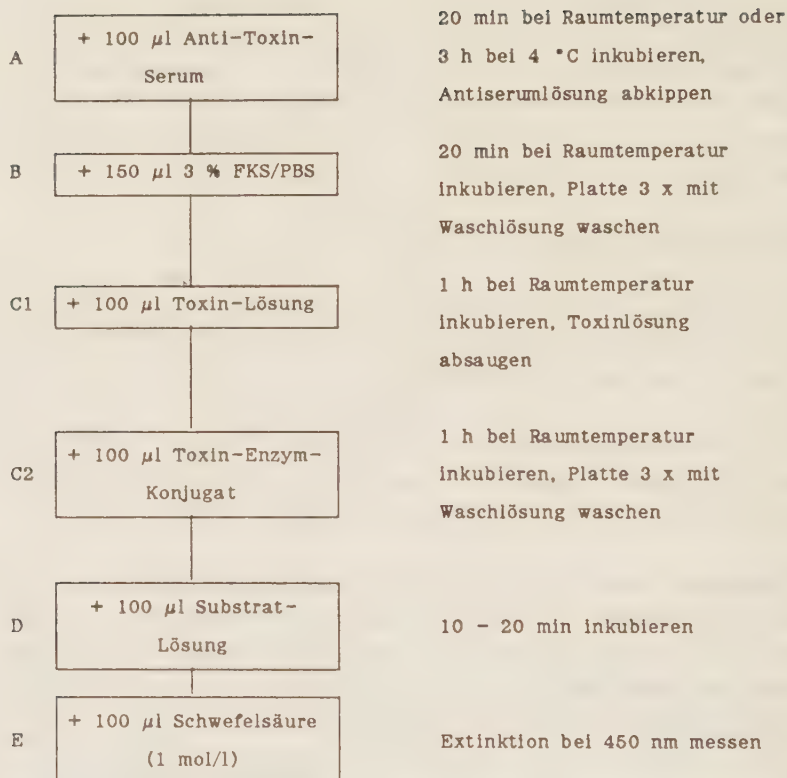


Abbildung 27a: Arbeitsschritte bei der Durchführung des konsekutiven Enzymimmunoassays in Mikrotiterplatten (Angaben in μ l pro Kavität)

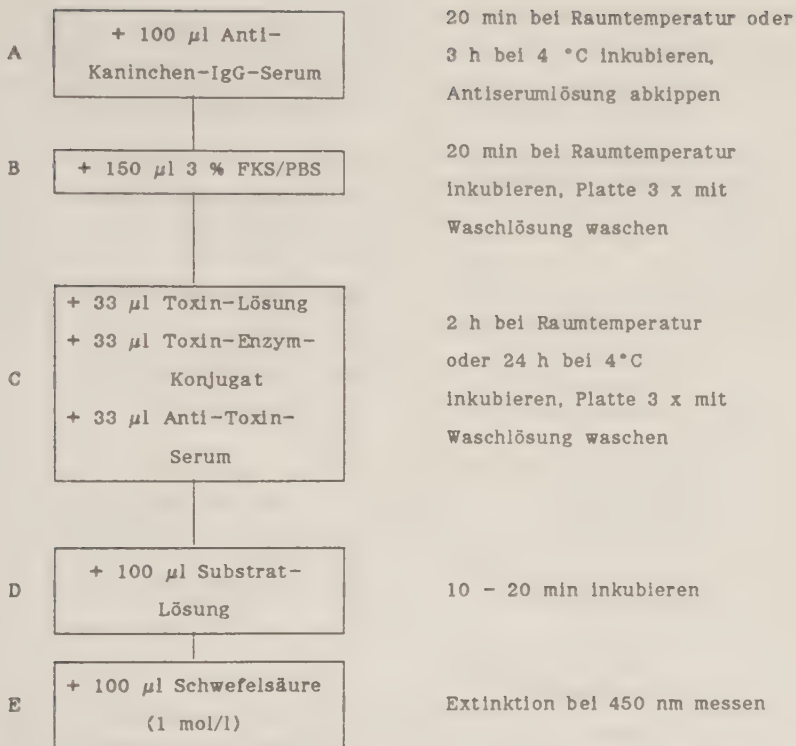


Abbildung 27b: Arbeitsschritte bei der Durchführung des simultanen (DASP) Enzymimmunitests in Mikrotiterplatten (Angaben in μ l pro Kavität)

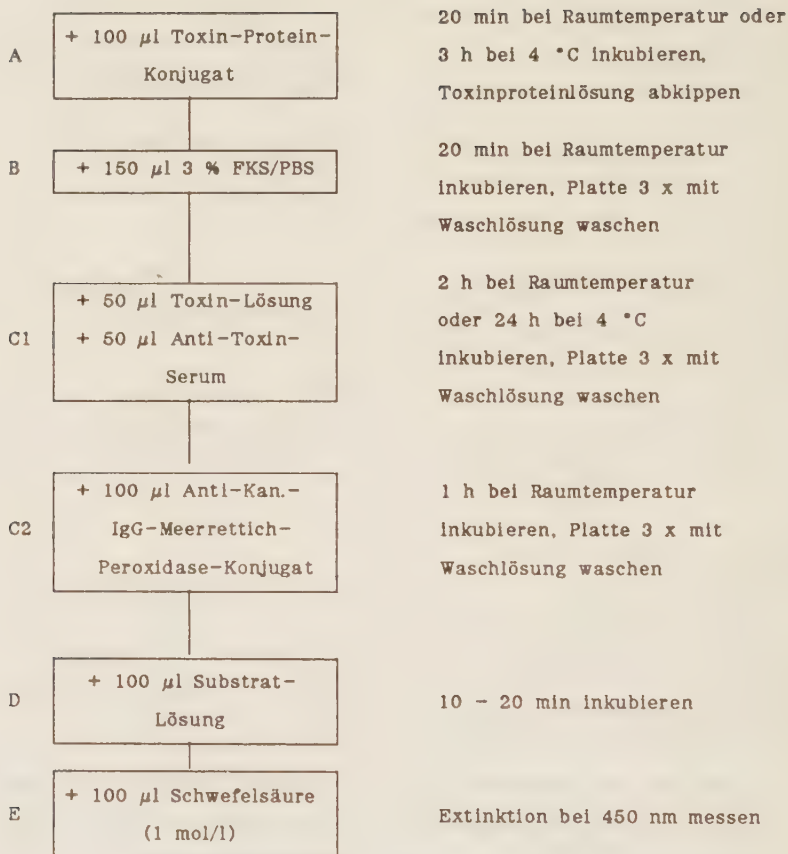


Abbildung 27c: Arbeitsschritte bei der Durchführung des indirekten Enzymimmuntests in Mikrotiterplatten (Angaben in μ l pro Kavität)

3.2.2.3 Versuche zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit

Zur Optimierung der Empfindlichkeit der Enzymimmuntests wurden die Antiserumverdünnungen und die Toxin-Enzym-Konjugat-Konzentrationen (direkte Testanordnung) bzw. die Menge des zur Beschichtung eingesetzten Toxin-Protein-Konjugates (indirekte Testanordnung) variiert. Für jede gewählte Kombination wurde der Test wie in 3.2.2.2 beschrieben durchgeführt und der Extinktionsunterschied zwischen einer toxinfreien und einer toxinhaltigen Probe bestimmt (Abb. 28). Für die weiteren Untersuchungen wurden die Kombinationen von Antiserum- und Konjugatverdünnungen gewählt, die bei einer maximalen Extinktion von 1,0 nach 20 min Substratumsatz den größten meßbaren Unterschied zwischen einer negativen und einer Probe mit definiertem Toxingehalt ermöglichten.

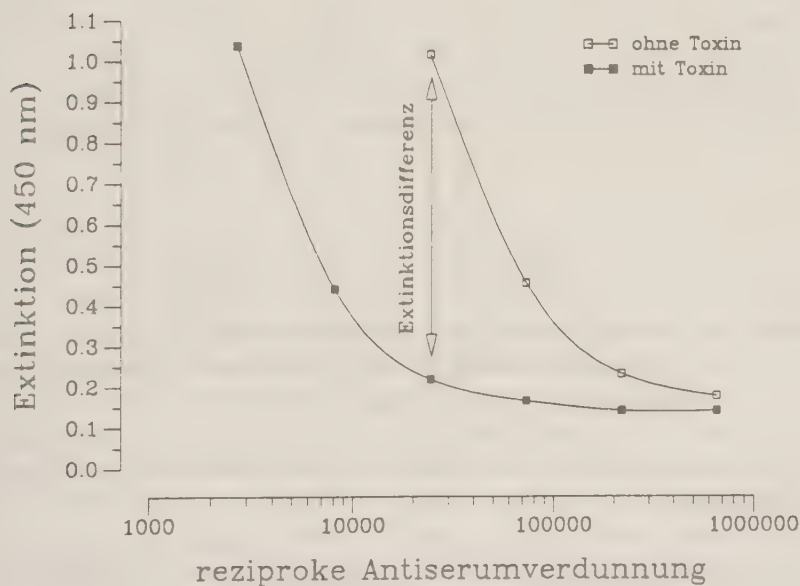


Abbildung 28: Ermittlung der optimalen Verdünnungen durch zweidimensionale Titration von Antiserum gegen Toxin-Enzym-Konjugat (hier nur eine Verdünnung dargestellt) mit und ohne Toxinzusatz

Mit den in Tab. 17 angegebenen Verdünnungen von Antiserum und Toxin-Enzym-Konjugat bzw. Toxin-Protein-Konjugat wurden Standardkurven mit unterschiedlichen Toxinkonzentrationen im Bereich von 1 pg/ml bis 1 µg/ml erstellt. Zum Vergleich der Eichkurven verschiedener Enzymimmuntests (Abb. 31) wurden alle Extinktionswerte in Prozent umgerechnet, wobei der Nullwert gleich 100 % gesetzt wurde.

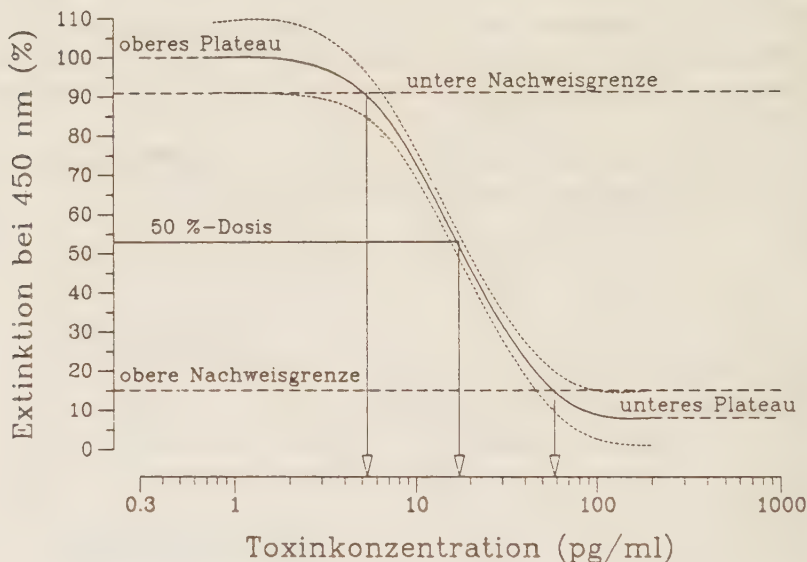


Abbildung 29: Charakterisierung von Standardkurven am Beispiel einer Eichkurve für Aflatoxin M_1 . Die unterbrochenen Linien geben den Vertrauensbereich für $p=0,05$ an.

Die Standardkurven wurden durch folgende, in Abb. 29 dargestellte Parameter charakterisiert:

Die untere Nachweisgrenze, d.h. die niedrigste Toxinkonzentration, die von einer negativen Probe (0-Dosis oder oberes Plateau) mit einer statistischen Sicherheit (t-Test) von 95 Prozent unterschieden werden konnte.

Die obere Nachweisgrenze, d.h. die höchste Toxinkonzentration, die von einer Probe mit gegen ∞ gehendem Toxingehalt (unteres Plateau) mit einer statistischen Sicherheit (t-Test) von 95 % unterschieden werden konnte.

50% Dosis, d.h. die Toxinkonzentration, die den Extinktionswert, der in der Mitte zwischen oberem und unterem Plateau liegt, ergab.

3.2.2.4. Charakterisierung der Spezifität der Testsysteme

Zur Bestimmung der Spezifität der Anti-Toxin-Seren in den enzymimmuno-logischen Nachweisverfahren wurden Kompetitionsversuche mit möglichst vielen strukturähnlichen Mykotoxinen durchgeführt.

In den Enzymimmuntests zum Nachweis von Aflatoxinen wurden die Aflatoxine B₁, B₂, M₁, M₂, G₁ und G₂ (Abb. 32), sowie die Aflatoxine P₁, Q₁, B_{2α} und Aflatoxinol (Abb. 1) in Konzentrationen von 0,01 bis 100 ng/ml geprüft. Für die Verfahren zum Nachweis von Trichothecenen wurden die in Abb. 33 aufgeführten Toxine in Konzentrationen von 1 bis 60000 ng/ml getestet, während die makrozyklischen Trichothecene (Abb. 34) in einem Bereich von 0,1 bis 1000 ng/ml eingesetzt wurden.

Für jedes dieser Toxine (X) wurden Standardkurven unter den in Tab. 18 angegebenen Bedingungen erstellt. Das direkte simultane Verfahren (Abb. 27b) wurde für die Enzymimmuntests zum Nachweis von Aflatoxin M₁, Aflatoxin B_{2α}, Ochratoxin A, Nivalenol, Roridin A und Verrucarín A verwendet, während für Fusarenon X das indirekte Verfahren getestet wurde. Zusätzlich wurde für Aflatoxin M₁ die konsekutive Testanordnung geprüft. Um den Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die spezifische Immunreaktion festzustellen, wurden die Versuche sowohl 2 h bei 20°C als auch 24 h bei 4°C durchgeführt. Der Einfluß einer heterologen Kombination von Antiserum und Toxin-Enzym-Konjugat (direkter Test) bzw. Toxin-Protein-Konjugat (indirekter Test) wurde für die Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M₁, Fusarenon X, Roridin A und Verrucarín A geprüft.

Als Maß für den Einfluß des Toxins X auf das Testsystem zum Nachweis von Toxin R wurde die 50%-Dosis (3.2.2.3) $[X_{50}]$ graphisch bestimmt (Abb. 30) und die relative Kreuzreaktion, d.h. das Verhältnis der Konzentration $[X_{50}]$

zu dem entsprechenden Wert $[R_{50}]$ des Referenztoxins (R) in Prozent berechnet:

$$\text{Kreuzreaktion für Toxin X relativ zu Toxin R} = \frac{[R_{50}]}{[X_{50}]} \times 100$$

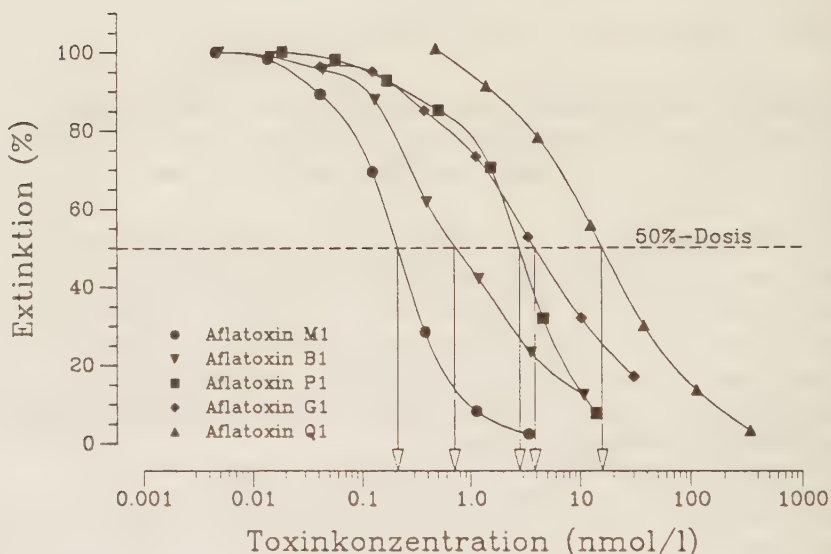


Abbildung 30: Graphische Bestimmung der 50%-Dosis für verschiedene Aflatoxine im Enzymimmunotest zum Nachweis von Aflatoxin M_1 (= Referenztoxin) zur Berechnung der relativen Kreuzreaktion (s. u.)

3.2.2.5 Ergebnisse

Die zur Durchführung der Enzymimmunotests in den verschiedenen Testanordnungen und für die homologe bzw. heterologe Kombination verwendeten Anti-Toxin-Serumverdünnungen und Toxin-Enzym- bzw. Toxin-Protein-Konjugatkonzentrationen sind in Tab. 17 angegeben. Als Charakteristika der mit den aufeinander abgestimmten Immunreagenzien unter verschiedenen Inkubationsbedingungen erstellten Standardkurven (Abb. 31) wurden in Tab. 18

die obere und untere Nachweisgrenze sowie die 50 %-Dosis aufgeführt. Für die Enzymimmuntests zum Nachweis von Mykotoxinen ergaben sich sehr unterschiedliche Nachweisgrenzen, die von 5 pg/ml (Aflatoxin M₁) bis 50 ng/ml (Nivalenol) reichen. Dabei zeigte sich auch der Einfluß der bei den einzelnen Testanordnungen verschieden großen Probenvolumina. Wurde wie im simultanen Test die Standardlösung durch die Antiserum- und Toxin-Enzym-Konjugatlösungen um den Faktor 3 verdünnt, war die resultierende Nachweisgrenze entsprechend niedriger als im vergleichbaren konsekutiven Testsystem.

Tabelle 17: Konzentrationen von Anti-Toxin-Seren und markiertem Antigen in den verschiedenen kompetitiven Testanordnungen

Anti-Toxin-Serum		markiertes Antigen		Kombination
gegen	Verdünnung	Bezeichnung	Konz. (ng/ml)	

Konsekutive Testanordnung (Abb. 27a):

Aflatoxin M ₁	1 : 6000	Aflatoxin M ₁ -HRP	7,5	homolog
Aflatoxin M ₁	1 : 6000	Aflatoxin B ₁ -HRP	21,4	heterolog

Simultane Testanordnung (DASP; Abb. 27b):

Aflatoxin M ₁	1 : 32000	Aflatoxin M ₁ -HRP	10,0	homolog
Aflatoxin M ₁	1 : 32000	Aflatoxin B ₁ -HRP	28,6	heterolog
Aflatoxin B _{2α}	1 : 10000	Aflatoxin B _{2α} -HRP	412,0	homolog
Ochratoxin A	1 : 10000	Ochratoxin A-HRP	408,4	homolog
Nivalenol	1 : 3333	Nivalenol-HRP	18600	homolog
Fusarenon X	1 : 10000	Fusarenon X-HRP	160,0	homolog
Roridin A	1 : 20000	Roridin A-HRP	4,1	homolog
Roridin A	1 : 13333	Verrucaridin A-HRP	39,4	heterolog
Verrucaridin A	1 : 20000	Verrucaridin A-HRP	24,6	homolog
Verrucaridin A	1 : 11666	Roridin A-HRP	60,8	heterolog

Indirekte Testanordnung (Abb. 27c):

Fusarenon X	1 : 35000	Fusarenon X-ABH-KLH	5000	heterolog
-------------	-----------	---------------------	------	-----------

Tabelle 18: Charakteristika der Standardkurven

Quantifizierung von	untere	50 %	obere	Inkubation		Kombination
	Grenze	Dosis ng/ml	Grenze	Zeit (h)	Temp. (°C)	

Konsekutive Testanordnung (Abb. 27a):

Aflatoxin M ₁	0,005	0,018	0,060	2	20	homolog
Aflatoxin M ₁	0,005	0,017	0,060	2	20	heterolog

Simultane Testanordnung (DASP; Abb. 27b):

Aflatoxin M ₁	0,041	0,084	0,370	24	4	homolog
Aflatoxin M ₁	0,018	0,070	0,370	24	4	heterolog
Aflatoxin M ₁	0,014	0,070	0,370	2	20	homolog
Aflatoxin M ₁	0,014	0,064	0,370	2	20	heterolog
Aflatoxin B _{2α}	0,090	0,550	2,000	24	4	homolog
Aflatoxin B _{2α}	0,170	0,620	3,000	2	20	homolog
Ochratoxin A	0,215	1,050	5,000	24	4	homolog
Nivalenol	50,0	400,0	2000	24	4	homolog
Nivalenol	60,0	500,0	3000	2	20	homolog
Fusarenon X	0,1	1,4	10,0	24	4	homolog
Fusarenon X	0,3	3,5	25,0	2	20	homolog
Roridin A	2,5	15,7	45,0	24	4	homolog
Roridin A	1,8	5,2	20,0	24	4	heterolog
Roridin A	3,0	16,0	50,0	2	20	homolog
Roridin A	3,0	10,7	37,0	2	20	heterolog
Verrucarín A	0,3	1,2	9,5	24	4	homolog
Verrucarín A	0,7	4,9	52,0	24	4	heterolog
Verrucarín A	0,2	1,2	12,5	2	20	homolog
Verrucarín A	0,9	7,4	100,0	2	20	heterolog

Indirekte Testanordnung (Abb. 27c):

Fusarenon X	0,4	6,4	100,0	2	20	heterolog
-------------	-----	-----	-------	---	----	-----------

Die 24-stündige Inkubation bei 4 °C erbrachte gegenüber der kürzeren Inkubationsdauer bei 20 °C geringe Verbesserungen in der Empfindlichkeit der Nachweisysteme.

Die heterologe Kombination von Anti-Toxin-Serum und Toxin-Enzym-Konjugat bei dem Enzymimmunoassay für Roridin A ermöglichte eine deutliche Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit, während das Testsystem für Aflatoxin M₁ durch dieses Verfahren nur unwesentlich empfindlicher wurde. Der heterologe Test zum Nachweis von Fusarenon X und Verrucaridin A ergab sogar schlechtere Werte als das homologe Verfahren.

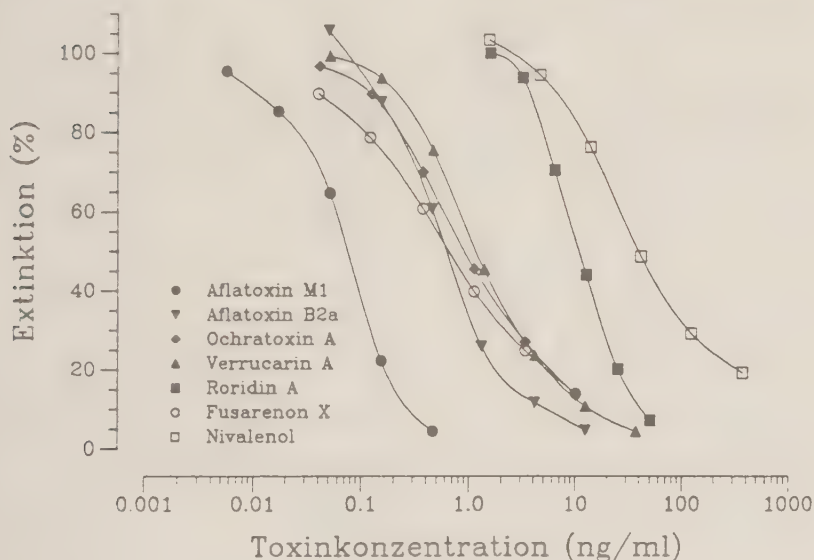
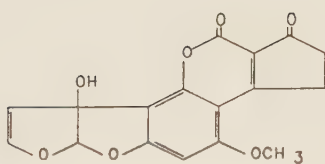
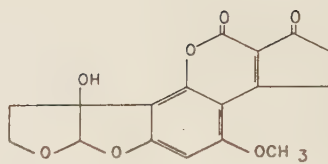


Abbildung 31: Vergleich der Standardkurven der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen (simultane Testanordnung; Inkubation jeweils 2 h bei 20°C)

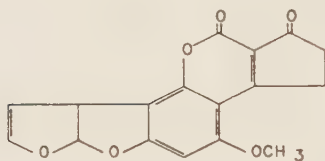
Die in den Wettbewerbsversuchen zur Prüfung der Spezifität ermittelten 50%-Dosen sowie die relative Kreuzreaktion sind in Tab. 19-23 zusammengestellt.



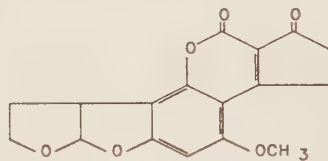
Aflatoxin M1



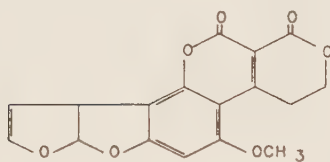
Aflatoxin M2



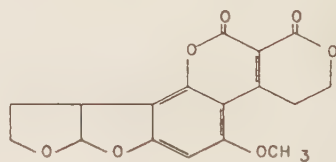
Aflatoxin B1



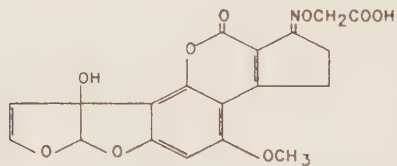
Aflatoxin B2



Aflatoxin G1



Aflatoxin G2



Aflatoxin M1-Oxim

Abbildung 32: Strukturformeln einiger Aflatoxine (weitere Formeln in Abb. 1)

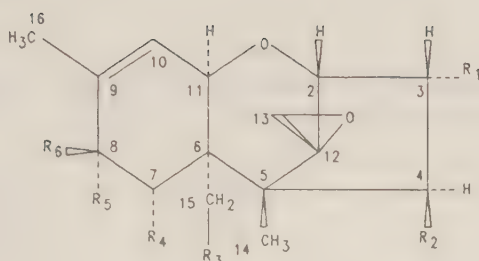
Tabelle 19: Spezifität des Antiserums gegen Aflatoxin M₁ im simultanen Test

Toxin	50%-Dosis (nmol/l)		Kreuzreaktion relativ zu Aflatoxin M ₁ (in %)	
	Konjugat I ^{a)}	II ^{b)}	I	II
<u>Inkubation: 24 h bei 4 °C</u>				
Aflatoxin M ₁	0,256	0,213	100,00	100,00
Aflatoxin M ₁ -Oxim	0,214	0,200	119,62	106,50
Aflatoxin M ₂	1,091	0,576	23,46	36,97
Aflatoxin B ₁	0,962	0,218	26,61	97,70
Aflatoxin G ₁	4,268	1,067	5,99	19,96
Aflatoxin P ₁	5,032	3,326	5,09	6,40
Aflatoxin B ₂	17,834	2,867	1,43	7,42
Aflatoxin Q ₁	28,991	8,809	0,88	2,42
Aflatoxin G ₂	> 30,30321	21,212	< 0,80	1,00
Aflatoxicol	71,629	10,410	0,36	2,05
Aflatoxin B _{2α}	333,333	37,272	0,08	0,57
<u>Inkubation: 2 h bei 20 °C</u>				
Aflatoxin M ₁	0,231	0,196	100,00	100,00
Aflatoxin M ₁ -Oxim	0,224	0,204	95,08	95,58
Aflatoxin M ₂	0,818	0,697	26,04	27,97
Aflatoxin B ₁	0,737	0,497	28,90	39,23
Aflatoxin G ₁	3,811	3,049	5,58	6,39
Aflatoxin P ₁	5,176	4,878	4,11	4,00
Aflatoxin B ₂	14,650	8,280	1,45	2,35
Aflatoxin Q ₁	29,390	22,267	0,72	0,88
Aflatoxin G ₂	> 30,303	> 30,303	< 0,70	< 0,70
Aflatoxicol	71,928	39,519	0,30	0,49
Aflatoxin B _{2α}	303,030	106,061	0,08	0,18

a) Aflatoxin M₁-HRP-Konjugat (homologes Testsystem)b) Aflatoxin B₁-HRP-Konjugat (heterologes Testsystem)

Tabelle 20: Spezifität des Antiserums gegen Aflatoxin B_{2α} im simultanen Test

Toxin	50%-Dosis (nmol/l)	Kreuzreaktion relativ zu Aflatoxin B ₂ (in %)
<u>Inkubation: 24 h bei 4 °C</u>		
Aflatoxin B ₂	1,146	145,46
Aflatoxin B _{2α}	1,667	100,00
Aflatoxin B ₁	2,051	81,28
Aflatoxin M ₁	4,116	40,50
Aflatoxin M ₂	12,424	13,42
Aflatoxin G ₂	39,394	4,23
Aflatoxin G ₁	53,354	3,12
Aflatoxin P ₁	46,980	3,55
Aflatoxicol	121,019	1,38
Aflatoxin Q ₁	222,561	0,75
<u>Inkubation: 2 h bei 20 °C</u>		
Aflatoxin B ₂	1,847	147,64
Aflatoxin B _{2α}	2,727	100,00
Aflatoxin B ₁	3,365	81,04
Aflatoxin M ₁	6,402	42,60
Aflatoxin M ₂	22,424	12,16
Aflatoxin G ₂	51,152	5,33
Aflatoxin G ₁	51,829	5,26
Aflatoxin P ₁	65,436	4,17
Aflatoxicol	165,605	1,65
Aflatoxin Q ₁	347,561	0,78



Toxin	Seitenkette					
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
T-2 Toxin	OH	Ac	Ac	H	IV	H
Iso-T-2 Toxin	Ac	OH	Ac	H	IV	H
Acetyl-T-2 Toxin	Ac	Ac	Ac	H	IV	H
HT-2 Toxin	OH	OH	Ac	H	IV	H
T-2 Triol	OH	OH	OH	H	IV	H
T-2 Tetraol	OH	OH	OH	H	OH	H
T-2 Tetraoltetraacetat	Ac	Ac	Ac	H	Ac	H
Diacetoxyscirpenol	OH	Ac	Ac	H	H	H
15-Acetoxyscirpenol	OH	OH	Ac	H	H	H
Scirpentriol	OH	OH	OH	H	H	H
Neosolanol	OH	Ac	Ac	H	OH	H
Verrucarol	H	OH	OH	H	H	H
4,15-Diacetylverrucarol	H	Ac	Ac	H	H	H
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O	
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	=O	
Fusarenon X	OH	Ac	OH	OH	=O	

Abbildung 33: Strukturformel des Trichothecengrundgerüsts und tabellarische Auflistung der Seitenketten für die getesteten nicht makrozyklischen Trichothecene. Abkürzungen: Ac=OCOCH₃ (Acetylrest); IV=OCOCH₂CH(CH₃)₂ (Isovalerylrest)

Tabelle 21: Spezifität des Antiserums gegen Nivalenol im simultanen Test
(Inkubation 2 h bei 20 °C)

Toxin	50%-Dosis ($\mu\text{mol/l}$)	Kreuzreaktion relativ zu Nivalenol (in %)
Nivalenol	0,080	100,00
T-2 Triol	0,017	470,59
Scirpentriol	0,156	51,28
T-2 Tetraol	0,285	28,07
Iso-T-2 Toxin	4,936	1,62
15-Acetoxy-scirpenol	5,093	1,57
Fusarenon X	25,424	0,31
Deoxynivalenol	> 202,70	< 0,04
Verrucarol	> 225,56	< 0,04

Tabelle 22: Spezifität des Antiserums gegen Fusarenon X

Toxin	50%-Dosis ($\mu\text{mol/l}$)		Kreuzreaktion relativ zu Fusarenon X (in %)	
	Konjugat Ia)	II ^{b)}	I	II
<u>Inkubation: 24 h bei 4 °C</u>				
Fusarenon X	0,0040	0,0116	100,00	100,00
T-2 Toxin	0,0013	0,0026	307,69	446,15
Diacetoxyscirpenol	0,0017	0,0092	235,29	126,09
Neosolaniol	0,0071	0,022	56,34	52,73
Iso-T-2 Toxin	0,060	0,088	6,66	13,18
Acetyl-T-2 Toxin	0,102	0,138	3,91	8,42
T-2 Tetraoltetra- acetat	0,076	0,137	5,25	8,45
HT-2 Toxin	0,347	0,354	1,50	2,06
Nivalenol	> 192,30	> 192,30	< 0,002	< 0,006
Deoxynivalenol	> 202,70	> 202,70	< 0,002	< 0,006
<u>Inkubation: 2 h bei 20 °C</u>				
Fusarenon X	0,0106	0,0169	100,00	100,00
T-2 Toxin	0,0034	0,0047	311,76	359,57
Diacetoxyscirpenol	0,0045	0,0142	235,56	119,01
Neosolaniol	0,029	0,035	36,18	48,84
Iso-T-2 Toxin	0,126	0,169	8,37	9,97
Acetyl-T-2 Toxin	0,199	0,230	5,33	7,34
T-2 Tetraoltetra- acetat	0,270	0,212	3,92	7,96
HT-2 Toxin	0,601	0,424	1,95	2,06
Nivalenol	> 192,30	> 192,30	< 0,006	< 0,008
Deoxynivalenol	> 202,70	> 202,70	< 0,006	< 0,008

a) Fusarenon X-Oxim-HRP-Konjugat (homologes Testsystem)

b) Fusarenon X-Hydrazon-KLH-Konjugat (heterologes Testsystem)

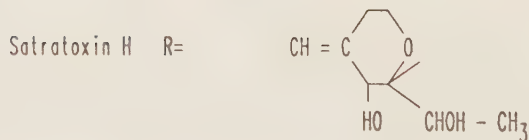
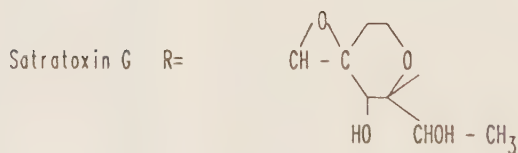
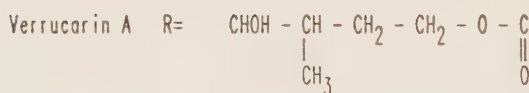
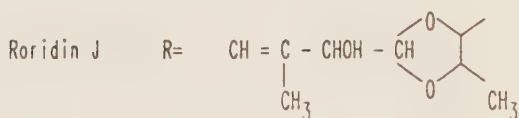
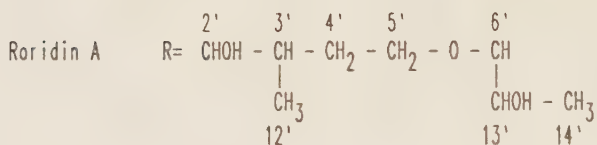
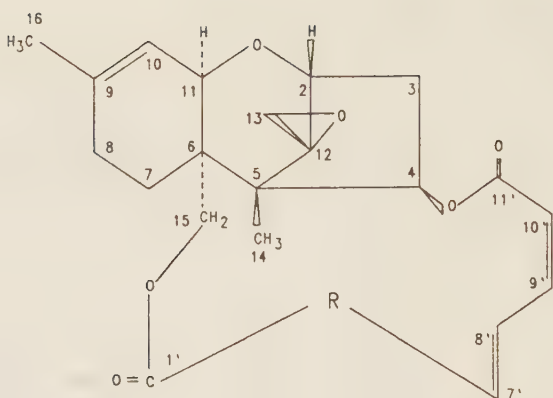


Abbildung 34: Strukturformeln der getesteten makrozyklischen Trichothecene

Tabelle 23: Spezifität des Antiserums gegen Roridin A im simultanen Test

Toxin	50%-Dosis ($\mu\text{mol/l}$)		Kreuzreaktion relativ zu Roridin A (in %)	
	Konjugat I ^{a)}	II ^{b)}	I	II
<u>Inkubation: 24 h bei 4 °C</u>				
Roridin A	0,011	0,010	100,00	100,00
Verrucarín A	0,086	0,017	12,97	58,82
Satratoxin H	0,653	0,149	1,68	67,10
Diacetylverrucarol	14,571	3,771	0,08	0,27
Verrucarol	139,098	39,474	< 0,01	0,03
<u>Inkubation: 2 h bei 20 °C</u>				
Roridin A	0,030	0,020	100,00	100,00
Roridin J	0,074	0,037	40,54	54,05
Verrucarín A	0,199	0,055	15,08	36,36
Satratoxin H	0,208	0,027	14,42	74,07
Satratoxin G	0,469	0,116	6,54	17,24
Diacetylverrucarol	19,046	3,660	0,16	0,55
Verrucarol	60,150	29,300	0,05	0,07

a) Roridin A-HRP-Konjugat (homologes Testsystem)

b) Verrucarín A-HRP-Konjugat (heterologes Testsystem)

Tabelle 24: Spezifität des Antiserums gegen Verrucarín A im simultanen Test

Toxin	50%-Dosis ($\mu\text{mol/l}$)		Kreuzreaktion relativ zu Verrucarín A (in %)	
	Konjugat I ^{a)}	II ^{b)}	I	II
<u>Inkubation: 24 h bei 4 °C</u>				
Verrucarín A	0,002	0,010	100,00	100,00
Roridin A	0,231	0,017	0,87	58,82
Satratoxin H	0,985	0,110	0,20	9,09
Diacetylverrucarol	3,943	0,377	0,05	2,65
Verrucarol	50,752	12,594	< 0,01	0,08
<u>Inkubation: 2 h bei 20 °C</u>				
Verrucarín A	0,002	0,015	100,00	100,00
Roridin A	0,291	0,027	0,69	55,56
Satratoxin H	1,326	0,208	0,15	7,21
Diacetylverrucarol	4,571	0,943	0,04	1,59
Verrucarol	85,714	25,564	< 0,01	0,06

a) Verrucarín A-HRP-Konjugat (homologes Testsystem)

b) Roridin A-HRP-Konjugat (heterologes Testsystem)

Es zeigte sich, daß mit den entwickelten Verfahren spezifisch die Toxine, die zur Immunogensynthese verwendet wurden, nachgewiesen werden konnten. Während die Variation der Inkubationsdauer und Temperatur kaum Einfluß auf die Spezifität der Enzymimmunotests hatte, wiesen die heterologen Verfahren im Vergleich zu den homologen Systemen eine zum Teil deutlich geringere Spezifität auf. Der Vergleich der simultanen Testanordnung mit dem konsekutiven Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M₁ (Tab. 25) ergab eine etwa 4-5 fach geringere Kreuzreaktion mit den Aflatoxinen B₁, M₂, G₁, B₂ und G₂ für den konsekutiven Test.

Tabelle 25: Vergleich der relativen Kreuzreaktion des Antiserums gegen Aflatoxin M₁ bei simultaner (A: 2 h bei 20 °C und B: 20 h bei 4 °C) und konsekutiver (C: 2 h bei 20 °C) Testanordnung

Toxin	Kreuzreaktionen relativ zu Aflatoxin M ₁ (in %)					
	Test	A	A	B	B	C
	Konjugat	I ^{a)}	II ^{b)}	I	II	I
Aflatoxin M ₁		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Aflatoxin M ₁ -Oxim		95,1	95,6	119,6	106,5	77,0
Aflatoxin B ₁		28,9	39,2	26,6	97,7	7,0
Aflatoxin M ₂		26,0	28,0	23,5	37,0	5,5
Aflatoxin G ₁		5,6	6,4	6,0	20,0	0,4
Aflatoxin B ₂		1,5	2,3	1,4	7,4	< 0,2
Aflatoxin G ₂		< 0,7	< 0,7	< 0,8	1,0	< 0,2

a) Aflatoxin M₁-HRP (homologes Testsystem)

b) Aflatoxin B₁-HRP (heterologes Testsystem)

Neben Angaben über den Einfluß strukturähnlicher Substanzen auf das Testsystem ermöglichen die durchgeführten Versuche auch Aussagen über die Molekülstrukturen, die die wesentlichen Beiträge zur Bindungsenergie der Antigen-Antikörper-Reaktion liefern.

So „erkennt“ das Antiserum gegen Aflatoxin M₁ vor allem Unterschiede am Difuran-Teil der verschiedenen Aflatoxine (Abb. 1 und 32), wobei im homologen Testsystem Aflatoxin M₂ (fehlende Doppelbindung) und Aflatoxin B₁ (fehlende Hydroxy-Gruppe) etwa die gleiche Bindungskonstante aufweisen. Eine zusätzliche Gruppe an diesem Molekülteil, wie zum Beispiel die Hydroxylfunktion des Aflatoxin B_{2α} (Abb. 1), reduziert die Reaktion mit dem Antikörper fast völlig. Das Antiserum gegen Aflatoxin B_{2α} dagegen unterscheidet nicht zwischen Aflatoxin B₁ und B_{2α} und zeigt die höchste Affinität für Aflatoxin B₂.

Bei der Reaktion des Antiserums gegen das Ketotrichothecen Nivalenol mit anderen Fusarientoxinen spielen die Reste an C₃, C₄ und C₁₅ (Abb. 33) die

entscheidende Rolle. Toxine, die an diesen drei Positionen die gleiche Struktur besitzen wie Nivalenol (zum Beispiel Scirpentriol, T 2-Triol und Tetraol), können vom Antiserum nicht unterschieden werden. In ähnlicher Weise reagierte das Antiserum gegen Fusarenon X mit T-2 Toxin, Diacetoxy-scirpenol und Neosolaniol, wobei die Strukturgleichheit an C₃ und C₄ ausschlaggebend war. Unterschiede an C₁₅ zeigten hier jedoch kaum Einfluß auf die Immunreaktion.

Die Wettbewerbsversuche (Tab. 23) mit makrozyklischen Trichothecen (Abb. 34) ergaben eine hohe Affinität des Antiserums gegen Roridin A für das Trichothecengrundgerüst in Verbindung mit dem makrozyklischen Ringsystem, während das Grundgerüst allein (Verrucarol, Abb. 33) lediglich eine sehr schwache Kreuzreaktion zeigte. Die getesteten makrozyklischen Trichothecene wurden unterschiedlich stark gebunden, wofür das Fehlen einer Seitenkette wie bei Verrucar A (an C₆) oder zusätzliche Ringstrukturen am Makrozyklus wie bei den Satratoxinen verantwortlich sind. In Tab. 24 sind die Ergebnisse für das Antiserum gegen Verrucar A aufgeführt. Dieser Test wies eine sehr hohe Spezifität für Verrucar A auf und zeigte im homologen Testsystem keine praktisch relevanten Kreuzreaktionen mit den anderen getesteten Toxinen.

3.2.3 Computerprogramm zur Auswertung kompetitiver Enzymimmunoassays

Zur Auswertung der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen wurde ein Computerprogramm in einer BASIC-Version (HP BASIC-Interpreter) für den Rechner HP 85 B und in einer PASCAL-Version (Turbo Pascal 3.0 Compiler, Borland International) geschrieben. Zur Nutzung des Pascalprogramms ist ein IBM-kompatibler Personal Computer mit mindestens 64 Kilobyte "Random Access Memory" (RAM) und ein Matrixdrucker (Epson FX 80-kompatibel) Voraussetzung. Soll die Standardkurve auf dem Bildschirm graphisch dargestellt werden, ist ein Farbgraphik- (CGA) oder erweiterter Farbgraphikadapter (EGA) erforderlich. Die Meßdaten können zwar auch über die Tastatur eingegeben werden, Idealerweise erfolgt die Übernahme jedoch "on line" von dem Mikrotiterplattenlesegerät und erfordert die Einhaltung eines definierten Pipettierschemas für die Anordnung von Standards und Proben auf der Platte. Beide Programmversionen wurden für die automatische Datenübernahme an den "Autoreader Mr 580" (Dynatech GmbH) angepaßt. Anschließend werden die Rohdaten sortiert und die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mehrfachansätze berechnet. Zur mathematischen Beschreibung der Standardkurve wurde eine kubische Splinefunktion gewählt. Der Vorteil dieser rein deskriptiven Art der Interpolation gegenüber mathematischen Funktionen, die auf theoretischen Modellvorstellungen der Antigen-Antikörperreaktion beruhen, liegt in der breiten Anwendungsmöglichkeit und der relativ einfachen Mathematik. Die Splinefunktion g (REINSCH, 1967) setzt sich stückweise aus Polynomen 3. Grades zusammen, ist im Bereich der Standardkonzentrationen $x_0, \dots, x_n$ zweimal stetig differenzierbar

und wird so konstruiert, daß
$$\int_{x_0}^{x_n} g''(x) \, dx \text{ minimiert wird.}$$

Dabei ist
$$\sum_{i=0}^n \left[\frac{g(x_i) - y_i}{\delta y_i} \right]^2 \leq s, \text{ wobei } s \text{ einen frei wählbaren Parameter}$$

darstellt, der die Glättung der Kurve g unter Berücksichtigung der Wichtung (δy_i) der Meßwerte (y_i) kontrolliert. Die Algorithmen zur Berechnung der Splinefunktion wurden einem ALGOL-Programm (REINSCH, 1968) entnommen und in BASIC bzw. PASCAL übersetzt. Der "Glättungsfaktor" s wird zunächst gleich Null gesetzt und solange automatisch erhöht bis die Splinefunktion keine relativen Maxima und Minima mehr aufweist und höchstens einen Wendepunkt besitzt. Diese Forderungen sind Voraussetzung für eine eindeutige Inter-

polation und für den Verlauf der Kurve in der typischen sigmoiden Form (NOLTE et al., 1976). Die Wichtung der Kurvenstützpunkte (Mittelwerte aus vier Meßwerten für jede Standardkonzentration) erfolgt nach ihren relativen Standardabweichungen, d.h. setzt sich ein Mittelwert aus stark differierenden Einzelwerten zusammen wird er im Gesamtverlauf der berechneten Kurve weniger berücksichtigt als ein Mittelwert mit geringer Standardabweichung. Zur optischen Kontrolle wird die Splinefunktion in definierten Abständen tabelliert, als Standardkurve auf dem Bildschirm graphisch dargestellt und dann auf den Drucker ausgegeben. Die Berechnung der Toxingehalte der Proben erfolgt anhand der für die Splinefunktion ermittelten Gleichung. Zusätzlich berechnet das Programm die eingesetzten Standardkonzentrationen mit der aufgestellten Gleichung neu und gibt als Maß für die Qualität des Tests deren prozentuale Abweichung vom Sollwert an.

Das gesamte Programm umfaßt in der PASCAL-Version etwa 1600 Zeilen Quelltext und belegt in kompilierter Form ca. 60 Kilobyte Speicherplatz im RAM des Rechners. Die Zeit für die Messung und Auswertung einer Mikrotiterplatte beträgt ca. zwei Minuten und wird hauptsächlich durch die vom Mikrotiterlesegerät vorgegebene Meßzeit und die für den Ausdruck der Daten und der Graphik benötigte Zeit bestimmt. Die reine Rechenzeit auf einem mit 8 Megahertz getakteten IBM AT 03 Personal Computer (16 Bit Mikroprozessor: Intel 80286) nimmt nur wenige Sekunden in Anspruch.

Abb. 35 zeigt einen mit dem ELISA-Programm erstellten Ausdruck der Ergebnisse eines Enzymimmunoassays zum Nachweis von Ochratoxin A in Schweineseren. Nach den Angaben zur Kennzeichnung des Tests sind im ersten Datenblock die Meßwerte entsprechend der Anordnung auf der Mikrotiterplatte ausgedruckt:

Spalte 2- 8, Reihe A-D: Standards 1-7 in Vierfachansätzen
 Spalte 9-11, Reihe A-D: Proben 1-3 in Vierfachansätzen
 Spalte 2-11, Reihe E-H: Proben 4-13 in Vierfachansätzen

Nach einem Approximationsschritt wies die berechnete Standardkurve keine relativen Extremwerte und nur einen Wendepunkt auf. Die Rückrechnung der eingesetzten Standardkonzentrationen anhand der Kurvengleichung ergab lediglich geringe Abweichungen von den Sollkonzentrationen, ein Hinweis auf eine präzise Testdurchführung.

Bestimmung von Ochratoxin A in Schweineseren

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0.121	0.223	0.341	0.514	0.559	0.586	0.562	0.183	0.359	0.414
B	0.120	0.216	0.363	0.488	0.582	0.602	0.538	0.181	0.327	0.425
C	0.107	0.228	0.355	0.520	0.575	0.587	0.570	0.193	0.318	0.421
D	0.108	0.208	0.333	0.469	0.551	0.565	0.564	0.199	0.369	0.379
E	0.477	0.055	0.132	0.193	0.267	0.676	0.619	0.628	0.637	0.593
F	0.514	0.057	0.137	0.205	0.288	0.752	0.699	0.584	0.715	0.659
G	0.419	0.053	0.130	0.193	0.278	0.731	0.768	0.747	0.708	0.684
H	0.497	0.038	0.123	0.192	0.268	0.757	0.747	0.761	0.754	0.698

S P L I N E A P P R O X I M A T I O N

Approximationsschritte: 1

Extremwerte: 0

Wendepunkte: 1

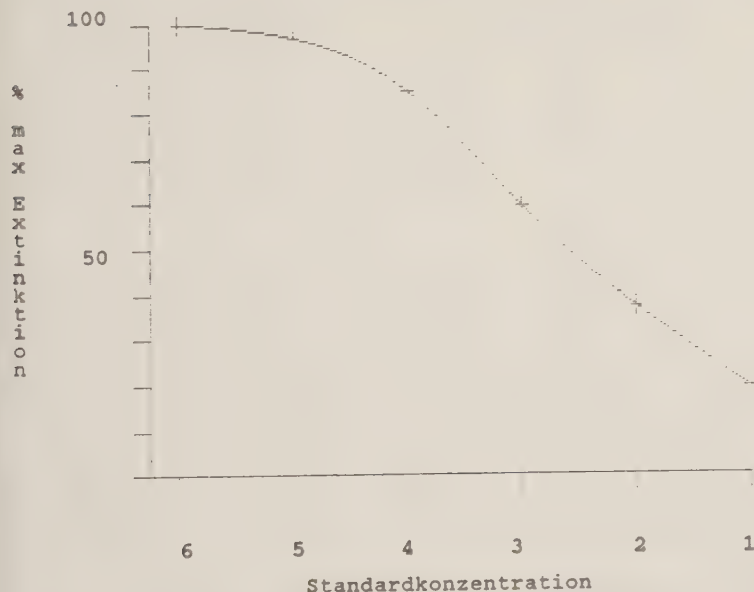


Abbildung 35: Computerauswertung eines Enzymimmotests zum Nachweis von Ochratoxin A

STANDARDS

Nr.	Konzentration pg/ml	EE Mittelw.	VK %	% EE	berechnet pg/ml	% Abweichung
1	10000.0	0.114	6.6	20.4	9999.2	0.0
2	3333.0	0.219	4.0	39.2	3341.0	0.2
3	1111.0	0.348	3.9	62.3	1115.0	0.4
4	370.0	0.498	4.8	89.1	370.9	0.2
5	123.0	0.567	2.5	101.5	124.0	0.8
6	41.0	0.585	2.6	104.7	43.1	5.2
7	0.0	0.558	2.5	100.0	0.0	

PROBEN

Nr.	EE Mittelw.	VK %	% EE	berechnet pg/ml	* Faktor	=
1	0.189	4.5	33.8	4514.9	1.000	4514.866
2	0.343	7.2	61.5	1156.5	5.000	5782.678
3	0.410	5.1	73.4	724.4	10.000	7243.936
4	0.477	8.7	85.4	444.5	20.000	8890.625
5	0.051	17.1	9.1			
6	0.130	4.4	23.4	8449.3	5.000	42246.440
7	0.196	3.2	35.0	4203.5	10.000	42034.884
8	0.275	3.6	49.3	1991.3	20.000	39825.093
9	0.729	5.1	130.5			
10	0.708	9.3	126.8			
11	0.680	12.9	121.8			
12	0.703	6.9	126.0			
13	0.658	7.1	117.9			

Fortsetzung Abbildung 35

3.2.4 Versuche zur Anwendung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren

3.2.4.1 Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver

Die Probenaufbereitung zum Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver mittels ELISA erfolgte im wesentlichen nach der von WINTERLIN et al. (1979) beschriebenen Methode und ist in Abb. 36 schematisch dargestellt.

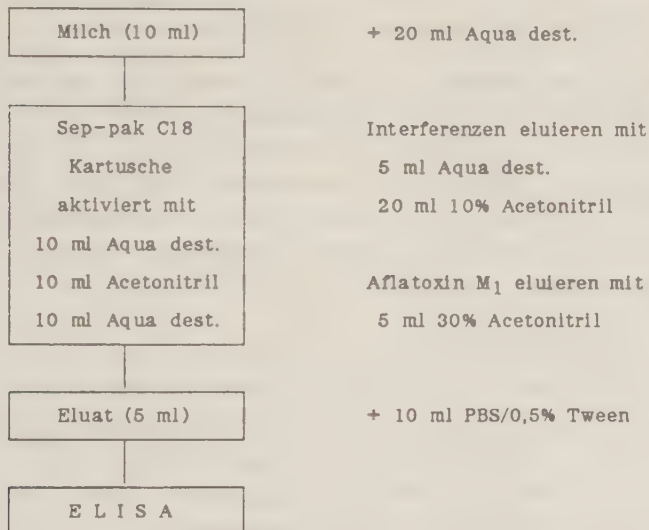


Abbildung 36: Probenaufbereitung zur Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch

Die gereinigten Extrakte wurden im direkten konsekutiven ELISA (Abb. 24 und 27a) eingesetzt und die Toxingehalte anhand einer Eichkurve (2,5 - 200 pg/ml) mit dem in 3.2.3 beschriebenen Computerprogramm berechnet.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden Milchproben mit Aflatoxin M₁-Zusatz im Bereich von 5 - 30 pg/ml untersucht. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \left[\frac{(\text{Toxingehalt der Probe mit Toxinzusatz} - \text{Toxingehalt der Probe ohne Toxinzusatz})}{\text{Toxinzusatz}} \right] \times 100$$

Zur Validierung der Methode wurden außerdem natürlich kontaminierte Milchpulverproben, deren Aflatoxin M₁-Gehalt mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt worden war, untersucht.

Zur Bereitstellung natürlich kontaminierter Milchproben wurden einer Fleckviehkuh 2,3 mg Aflatoxin B₁ in 10%iger ethanolischer Lösung verabreicht und Milchproben beginnend mit dem ersten Gemelk nach der Toxinapplikation über einen Zeitraum von sieben Tagen gesammelt.

3.2.4.2 Bestimmung von Ochratoxin A in Schweineserum

Die Bestimmung von Ochratoxin A in Schweineserum wurde gleichzeitig mit ELISA und HPLC durchgeführt, da kein Referenzmaterial zur Validierung der enzymimmunologischen Ergebnisse zur Verfügung stand. Um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde eine Probenaufbereitung - in Anlehnung an die von HULT et al. (1979) und BAUER et al. (1984) beschriebenen Verfahren - entwickelt, die für beide Methoden gleichzeitig verwendet werden konnte (Abb. 37).

Die gereinigten Extrakte wurden in PBS aufgenommen und im direkten simultanen ELISA (Abb. 26 und 27b) untersucht. Die Toxingehalte wurden anhand einer Eichkurve (Abb. 39) mit dem in 3.2.3 beschriebenen Computerprogramm berechnet. Der Rest der Probe wurde für die HPLC ca. 18fach konzentriert, um eine dem Immunotest vergleichbare Empfindlichkeit zu erreichen und unter folgenden Bedingungen analysiert:

Säule: 250 x 4,6 mm (gefüllt mit sphärischem C₈-Material mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 5 µm)
Eluent: Acetonitril/Wasser/Essigsäure (57/41/2)
Fluß: 1 ml/min
Detektion: Fluoreszenzemission bei 440 nm (Exzitation bei 330 nm)

Zur Erstellung der Eichkurve wurden Ochratoxin A-Standards im Bereich von 100 bis 1000 pg gemessen und die Regressionsgerade berechnet (Abb. 39). Die Toxingehalte wurden anhand der Geradengleichung ermittelt.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden Schweineseren mit Ochratoxin A-Zusatz im Bereich von 0,5 - 5,0 ng/ml untersucht. Die Berechnung erfolgte wie in 3.2.4.1 beschrieben.

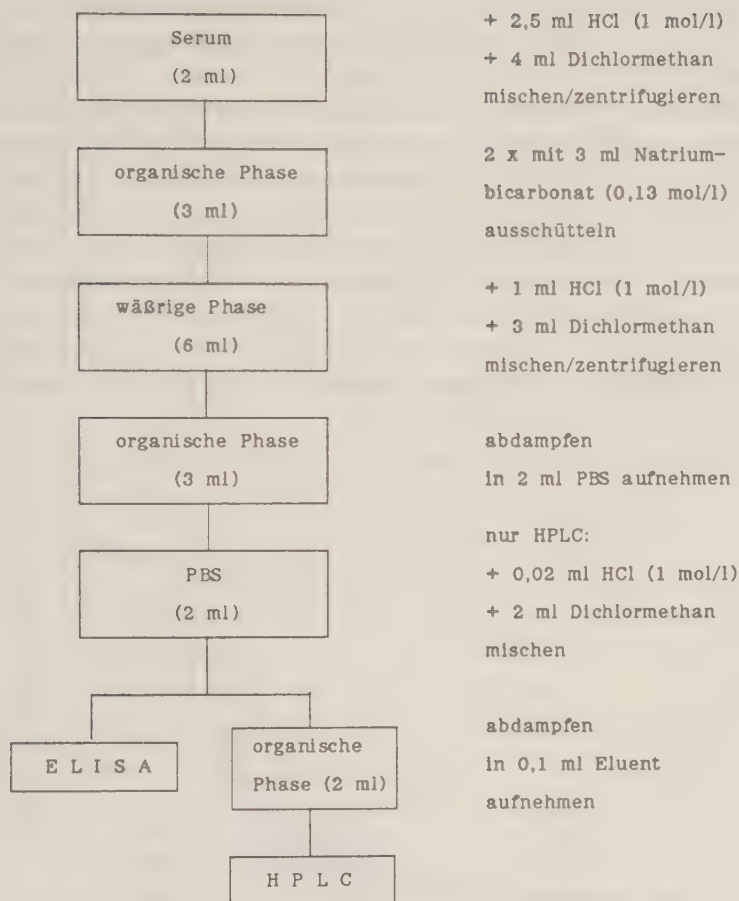


Abbildung 37: Probenaufbereitung zum Nachweis von Ochratoxin A in Schweineserum mit ELISA und HPLC

3.2.4.3 Ergebnisse

Um Einflüsse der Probenmatrix auf das Testsystem zu minimieren, wurde das Untersuchungsmaterial aufbereitet. Für den Enzymimmunotest zum Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver erwies sich ein Clean-up mit Einmalkartuschen (Sep-pak^R C18) als ausreichend (Abb. 36).

Tabelle 26: Bestimmung von Aflatoxin M₁ in künstlich kontaminierter Milch

Toxinzusatz (pg/ml)	$\bar{x} \pm s$ (pg/ml)	Wieder- findung (%)	VK (%)	n
5	4,7 + 0,84	94,1	17,8	16
10	9,3 + 1,43	93,7	15,2	13
20	18,5 + 2,24	92,8	12,0	13
30	28,4 + 3,63	94,9	12,7	13

Tabelle 27: Bestimmung von Aflatoxin M₁ in natürlich kontaminiertem Milchpulver (1:10 rekonstituiert)

$\bar{x} \pm s$ (n)	
ELISA (pg/ml)	DC (pg/ml)
< 2,5	< 4 ^{a)}
5 + 1,2 (4)	5 + 1,0 (3) ^{a)}
13 + 1,1 (4)	11 + 0,6 (3) ^{a)}
21 + 1,4 (4)	18 + 1,6 (3) ^{a)}
39 + 6,1 (4)	33 + 2,1 (3) ^{a)}
11 + 1,0 (5)	10 ^{b)}
27 + 4,2 (6)	30 ^{b)}
93 + 11,2 (8)	90 ^{b)}

- a) Die dünnstschichtchromatographischen Untersuchungen in Anlehnung an die Schuller-Methode (§ 35 LMBG, 01.00-14) wurden in der milchwirtschaftlichen Untersuchungs- und Versuchsanstalt Kempten (Allgäu) durchgeführt.
- b) Mittlerer Aflatoxin M₁-Gehalt von Milchpulverproben, die freundlicherweise von H.P. van Egmond, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, NL-Bilthoven, zur Verfügung gestellt wurden.

In Tab. 26 sind die Wiederfindungsraten für Aflatoxin M₁, das pasteurisierter Vollmilch zugesetzt wurde, angegeben. Konzentrationen von 5 pg/ml konnten

noch mit akzeptabler Streuung und Genauigkeit ermittelt werden. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate lag bei etwa 94 %.

Zum Vergleich mit herkömmlichen Methoden wurden fünf verschiedene Vollmilchpulver- und vier verschiedene Magermilchpulverproben, deren mittlere Aflatoxin M_1 -Gehalte - bestimmt mittels Dünnschichtchromatographie (DC) - bekannt waren, untersucht. Die gemessenen Aflatoxin M_1 -Gehalte lagen zwischen 2 und 90 ng/g. Die Werte, die im ELISA ermittelt wurden, lagen im Durchschnitt etwas über den dünn-schichtchromatographisch bestimmten. Die Schwankungsbreite, gemessen an der Standardabweichung bei Mehrfachbestimmungen, ist bei beiden Methoden etwa identisch. Hervorzuheben ist die ausgesprochen deutliche Korrelation der Ergebnisse ($r = 0,99$).

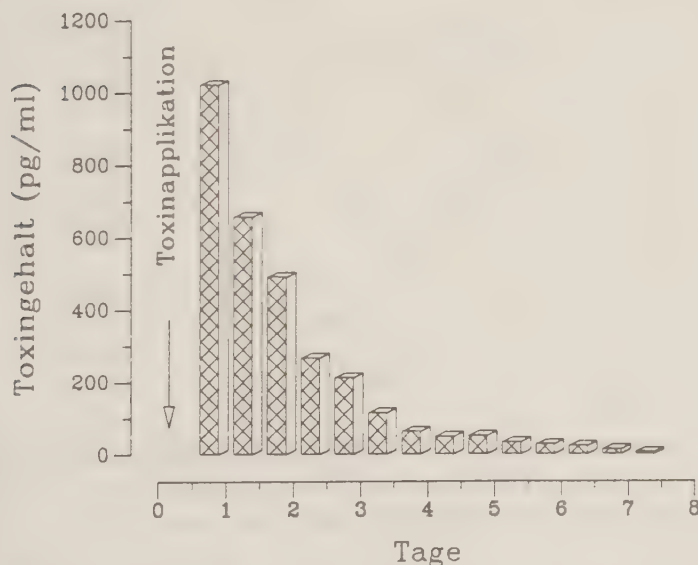


Abbildung 38: Aflatoxin M_1 -Gehalte in der Milch einer Fleckviehkuh nach Applikation von 2,3 mg Aflatoxin B_1 , bestimmt mittels ELISA

In dem Fütterungsversuch (Abb. 38) wurde die höchste Toxinkonzentration in dem ersten Gemelk, ca. 8 h nach der Toxinzufuhr, gemessen. Erhöhte Toxingehalte in der Milch konnten nach der einmaligen Toxinapplikation bis zum sechsten Tag festgestellt werden.

Zum Nachweis von Ochratoxin A in Schweineserum wurden die Seren durch Flüssig-Flüssig-Verteilung aufgereinigt. Diese Methode eignet sich für Ochratoxin A besonders gut, da dieses Toxin als monobasische Säure pH-abhängig sowohl in wässrigen als auch in organischen Lösungsmitteln selektiv angereichert werden kann. Für die Untersuchung der Proben im ELISA war eine Extraktion des ersten Dichlormethanauszuges mit Natriumbicarbonatlösung und eine Rückextraktion in Dichlormethan nötig, um unspezifische Einflüsse auf das Testsystem möglichst gering zu halten. Da die absolute Empfindlichkeit des HPLC-Systems, wie der Vergleich der Standardkurven beider Methoden zeigt (Abb. 39), deutlich unter der des enzymimmunologischen Verfahrens liegt, wurden die Proben für die HPLC-Analyse nochmals konzentriert.

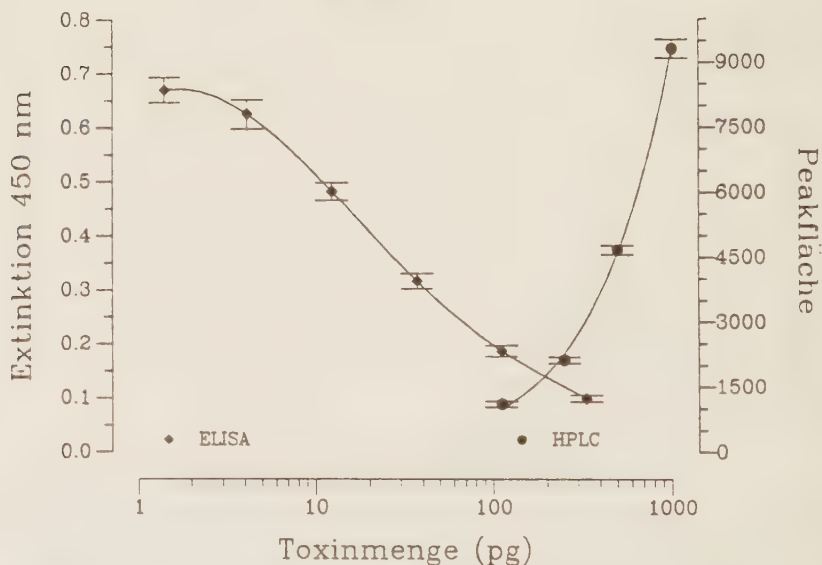


Abbildung 39: Vergleich der Standardkurven zur Quantifizierung von Ochratoxin A mittels ELISA und HPLC (aufgrund der logarithmischen Skalierung der X-Achse zeigt die Eichgerade für die HPLC-Analyse parabelähnliche Form)

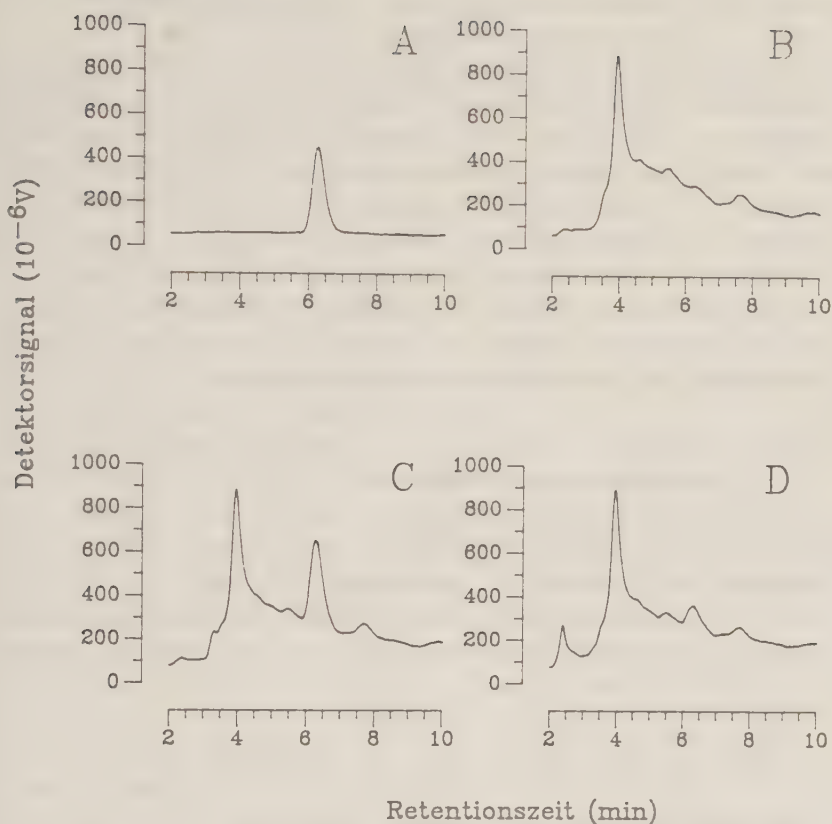


Abbildung 40: HPLC-Chromatogramme zur Analyse von Ochratoxin A (Ochratoxin A-Standard (A); Schweineserum ohne Toxinzusatz (B) mit Zusatz von 2,5 ppb (C) und 0,5 ppb (D) Ochratoxin A)

Wie die HPLC-Chromatogramme in Abb. 40 zeigen, wurden unter den gewählten Analysenbedingungen die im Extrakt verbleibenden Bestandteile der Probenmatrix sehr gut vom Ochratoxin A-Peak abgetrennt. Ochratoxin A-Konzentrationen von 0,5 ppb konnten noch deutlich von einer negativen Probe unterschieden werden.

Tabelle 28: Bestimmung von Ochratoxin A in künstlich kontaminiertem Schweineserum mittels ELISA

Toxinzusatz (ng/ml)	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	Wieder- findung (%) ^{*)}	VK (%)	n
0,5	0,45 + 0,090	71,6	19,8	6
1,0	0,76 + 0,093	67,5	12,1	6
2,5	2,15 + 0,311	82,5	14,4	6
5,0	3,53 + 0,384	68,7	10,9	6

^{*)} Mittelwert des Serums ohne Toxinzusatz: 0,094 ng/ml

Tabelle 29: Bestimmung von Ochratoxin A in künstlich kontaminiertem Schweineserum mittels HPLC

Toxinzusatz (ng/ml)	$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	Wieder- findung (%) ^{*)}	VK (%)	n
0,5	0,51 + 0,039	51,4	7,6	5
1,0	0,79 + 0,033	54,0	4,2	5
2,5	1,67 + 0,194	56,7	11,6	5
5,0	2,87 + 0,288	51,7	10,0	5

^{*)} Mittelwert des Serums ohne Toxinzusatz: 0,253 ng/ml

In Tab. 28 und 29 sind die Wiederfindungsraten für Ochratoxin A, das Schweineserum zugesetzt wurde, für beide Methoden angegeben. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate aus Proben mit 0,5 bis 5,0 ng Ochratoxin A/ml lag bei $73 \pm 14,3$ % für den ELISA und bei $53 \pm 8,4$ % für die HPLC. Der geringeren Wiederfindung bei der HPLC-Analyse liegen Toxinverluste bei dem letzten Konzentrierungsschritt zugrunde. Da diese aber über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich konstant blieben und somit rechnerisch ausgeglichen werden konnten, wurde die Methode nicht weiter optimiert.

Aufgrund der Risiken (REISS, 1981), die hinsichtlich einer Aufnahme von Mykotoxinen mit der Nahrung für die menschliche Gesundheit angenommen werden, müssen für einen gezielten Schutz des Verbrauchers besonders gefährdete Lebensmittel regelmäßig kontrolliert werden. Der Großteil der Untersuchungen beruht auf physikalisch-chemischen Methoden, die zwar die geforderte Empfindlichkeit und Genauigkeit aufweisen, meist jedoch mit hohen Kosten und großem technischen Aufwand verbunden sind, so daß für die zuständigen Stellen die Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln im notwendigen Umfang eine kaum zu bewältigende Aufgabe darstellt. Nur durch den Einsatz schneller und einfacher Analysenmethoden kann der Verbraucherschutz verbessert werden (KIERMEIER, 1985).

Eine Alternative zu den physikalisch-chemischen Methoden stellen serologische Verfahren dar, die mit der Gewinnung von Antisera gegen Mykotoxine, darunter gegen die in lebensmittelhygienischer Hinsicht wichtigen Aflatoxine B₁ und M₁, Ochratoxin A, Trichothecene und Zearalenon (Literaturangaben s. Tab. 5), möglich wurden. Bedeutung kommt hier vor allem radioimmunologischen (Tab. 7) und enzymimmunologischen (Tab. 8) Verfahren zu.

4.1 Mykotoxinderivate

Zur Herstellung der Toxin-Protein- und der Toxin-Enzym-Konjugate mußten die verwendeten Mykotoxine, mit Ausnahme des Ochratoxin A, das bereits eine freie Säuregruppe besitzt, und des Aflatoxin B_{2a}, das für die Kopplung zu einem Aldehyd reduziert wurde, zunächst derivatisiert werden. Die mittels dieser Reaktion in das Molekül eingeführte Seitenkette bildet die Brücke zum Proteinträger und stellte eine reaktive Carboxy- bzw. Aminogruppe für die Kopplungsreaktion bereit.

Die Derivatisierungsreaktionen mit Carboxymethoxylamin zur Umsetzung von Aflatoxin M₁ und B₁ wurden in Anlehnung an die von CHU et al. (1977) beschriebene Methode mit Pyridin als Katalysator in der Rückflußdestille durchgeführt. Wie bereits von BIERMANN und TERPLAN (1980) für Aflatoxin B₁ beschrieben, konnte damit eine fast vollständige Umsetzung zu Oximderivaten

erreicht werden. Allerdings entstanden neben dem gewünschten Produkt auch mehrere Beiprodukte, so daß in den späteren Versuchen zur Umsetzung von Nivalenol und Fusarenon X zu Oximen die Reaktion in Gegenwart von Natriumacetat als Puffer durchgeführt wurde, um eine mäßige Säurekonzentration, bei der einerseits genügend freie Stickstoffbase für die nukleophile Addition an die Carbonyl-Gruppe und andererseits auch Säure vorhanden ist, um die Eliminierung von Wasser aus dem resultierenden Hemiaminal zu katalysieren (STREITWIESER und HEATHCOCK, 1980). Diese bei Raumtemperatur ablaufende Reaktion ermöglicht gerade für die im Vergleich zu den Aflatoxinen nur schwach UV-absorbierenden Ketotrichothecene eine bessere Verlaufskontrolle in der HPLC bzw. DC, da zu den entsprechenden Retentionszeiten bzw. Rf-Werten Überlagerungen durch das stark UV-absorbierende Pyridin vermieden werden. Die Umsetzung von Fusarenon X mit 4-Aminobenzoesäurehydrazid stellt ebenfalls eine Kondensationsreaktion dar und wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Zur Einführung einer Säuregruppe in die eine bzw. zwei Hydroxygruppen enthaltenden makrozyklischen Trichothecene Verrucarlin A und Roridin A wurden die zyklischen Anhydride der Glutarsäure bzw. der Bernsteinsäure als Derivatisierungsreagenzien eingesetzt. Wie von CHU et al. (1979) für T-2 Toxin beschrieben, konnte damit eine beinahe vollständige Umsetzung zu Verrucarlin A-Hemiglutarat bzw. Roridin A-Hemisuccinat erreicht werden.

Zur Reinigung der Toxinderivate wurde die präparative HPLC eingesetzt, mit der für die späteren Kopplungsreaktionen sehr saubere Toxinderivatpräparationen bereitgestellt werden konnten. Als Vorteil gegenüber der vielfach verwendeten präparativen DC ist vor allem die höhere Sicherheit beim Umgang mit toxischen Substanzen hervorzuheben.

Die Dihemisuccinatstruktur des Roridin A-Derivates wurde durch Massenspektrometrie und ^1H -Kernresonanzspektroskopie abgesichert. Die Charakterisierung der übrigen Toxinderivate erfolgte chromatographisch und spektroskopisch, da bei den Umsetzungsreaktionen immer nur ein Hauptderivat entstand und auch in der Literatur zu den angewandten Methoden keine Hinweise auf mögliche Nebenreaktionen gefunden wurden. Die Carboxymethoxylaminderivate können nach KOHEN et al. (1974) allerdings als *syn* (*cis*)- oder *anti* (*trans*)- Formen bzw. in einem für das jeweilige Molekül

charakteristischem Mischungsverhältnis beider stereoisomerer Formen vorliegen, da die C=N Doppelbindung keine freie Rotation zuläßt.

4.2 Toxin-Protein-Konjugate

Ochratoxin A wurde mittels der gemischten Anhydridmethode an das Protein gebunden. Wie von BIERMANN und TERPLAN (1980) für Aflatoxin B₁ beschrieben, konnte auch mit Ochratoxin A als Hapten mit dieser Methode ein hoch substituiertes Toxin-Protein-Konjugat synthetisiert werden. Die geringste Kopplungsrate wurde bei der Bindung von Aflatoxin M₁ an HSA mit der Carbodilimidmethode erzielt. Dieses Verfahren ist zwar einfach in der Durchführung, zeigt jedoch neben der geringen Effektivität einen weiteren nachteiligen Nebeneffekt:

Unter den in Anlehnung an CHU und UENO (1977) gewählten Reaktionsbedingungen scheint die in Abb. 6 dargestellte Nebenreaktion (IV d) bevorzugt abzulaufen. Es werden bei der Immunisierung mit diesem Toxin-Protein-Konjugat neben Antikörpern gegen das Mykotoxin auch solche gegen das Harnstoffderivat gebildet. Wird zur Herstellung des enzymmarkierten Toxins (für den direkten Enzymimmunotest) das gleiche Carbodilimid verwendet, enthält das Enzym als determinante Gruppe ebenfalls das Harnstoffderivat. Überwiegen die gegen das Harnstoffderivat gebildeten Antikörper deutlich gegenüber den gegen das Mykotoxin gerichteten, erhält man ein Testsystem, bei dem das Enzym zwar vom Antiserum gebunden wird, diese Bindung jedoch durch Zugabe von freiem Toxin wenig oder nicht reduziert werden kann. Dieser Extremfall wurde bei der Kombination von Antiserum gegen Aflatoxin M₁ und dem in 3.2.13 beschriebenen, mit der Carbodilimidmethode synthetisierten Aflatoxin M₁-HRP-Konjugat beobachtet. Selbst bei Zugabe von 1 µg Aflatoxin M₁/ml konnte keine Reduktion der gebundenen Enzymmenge erreicht werden, während die Verwendung eines mit einer anderen Kopplungsmethode hergestellten Aflatoxin M₁-Enzym-Konjugates ein hochempfindliches Testsystem ergab (Abb. 41). Die gleichen Schwierigkeiten traten bei den am Institut entwickelten enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von T-2 Toxin (ESGIN, 1987) und Diacetoxyscirpenol (KLAFFER et al., 1988) auf und sind in der Literatur mehrmals erwähnt (GOODFRIEND et al., 1964; KURZER und DOURAGHI-ZADEH, 1967; BAUMINGER und WILCHEK, 1980; WOOD, 1984).

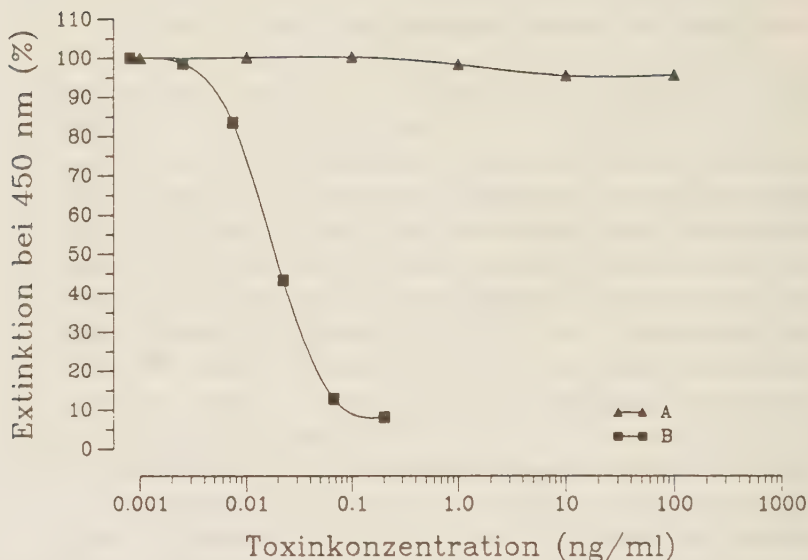


Abbildung 41: Vergleich der Hemmkurven des Enzymimmunitests zum Nachweis von Aflatoxin M_1 bei Verwendung eines mit der Carbodiimidmethode (A) bzw. mit der aktiven Estermethode (B) synthetisierten Aflatoxin M_1 -Enzym-Konjugates. Das Antiserum gegen Aflatoxin M_1 wurde nach Immunisierung von Kaninchen mit einem Aflatoxin M_1 -HSA-Konjugat gewonnen, das ebenfalls unter Verwendung der Carbodiimidmethode hergestellt worden war.

Die Verwendung der aktiven Estermethode sowohl zur Immunogensynthese als auch zur Toxin-Enzym-Konjugat-Herstellung erwies sich als brauchbare Alternative. Die erzielten Kopplungsraten (Tab. 13) sind, berücksichtigt man die zur Kopplung eingesetzte Menge an Toxin, durchaus mit den mittels der gemischten Anhydridmethode hergestellten Konjugaten vergleichbar. Gute Resultate lieferte diese Methode auch bei der Synthese der Toxin-Enzym-Konjugate. Die Restaktivität der Peroxidase lag im Bereich von 57-86 % (Tab. 15). Hinweise auf Nebenreaktionen wie bei der Carbodiimid- (s. o.) oder der gemischten Anhydridmethode (GENDLOFF et al., 1986) wurden in keinem der erstellten Nachweisverfahren beobachtet.

4.3 Spezifische Antitoxinseren

Zur Gewinnung von Antiseren gegen Mykotoxine wurden Gruppen von 3-4 Kaninchen die synthetisierten Immunogene appliziert. Wie auch von HARDER und CHU (1979) beschrieben, konnte mit dem Aflatoxin M₁-HSA-Konjugat - trotz der geringen Kopplungsrate - in allen immunisierten Tieren ein spezifischer Antikörpertiter induziert werden. Das Aflatoxin B_{2α}-HSA-Konjugat zeigte gute immunogene Wirksamkeit, wie sie auch von anderen Autoren gefunden wurde (GAUR et al., 1981; JACKMAN, 1985). In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß bei der Gewinnung von Antiseren gegen Aflatoxine Kaninchen als Versuchstiere besonders geeignet erscheinen, wie auch Untersuchungen von GAUR et al. (1980) zeigen.

Ochratoxin A war das erste Mykotoxin, gegen das - fast gleichzeitig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen - Antiseren gewonnen wurden (AALUND et al., 1975; CHU et al., 1976). Die bereits im Molekül vorhandene Säuregruppe und die damit ohne Derivatisierung mögliche Kopplung an ein Trägerprotein erleichtern den Umgang mit diesem Toxin. Über gute Immunogenität des Ochratoxin A-HSA-Konjugates, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, berichten auch die weiteren in Tab. 5 aufgeführten Autoren. Neben Serumalbumin wurden zur Gewinnung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen Ochratoxin A auch γ -Globuline von Rind und Mensch als Träger verwendet (AALUND et al., 1975; CANDLISH et al., 1986).

Arbeiten zur Gewinnung von Antiseren gegen die Ketotrichothecene Nivalenol und Fusarenon X wurden bis jetzt nicht publiziert. ZHANG et al. (1986b) und FAN et al. (1987) weisen lediglich auf Fehlschläge bei der Gewinnung von Antiseren gegen Deoxynivalenol bzw. T-2 Tetraol, zwei von der chemischen Struktur her dem Nivalenol sehr ähnliche Toxine, hin. Die schlechte Immunogenität des aus dem sehr polaren Nivalenol (4 Hydroxygruppen) und HSA synthetisierten Konjugates zeigte sich auch bei den eigenen Immunisierungsversuchen. Nach der Grundimmunisierung und zwei weiteren Immunogenapplikationen konnte nur in einem von drei Kaninchen kurzzeitig ein Antikörperspiegel erreicht werden, der für die weiteren Untersuchungen ausreichend war. FAN et al. (1987) führen mangelnde Immunogenität ihres T-2 Tetraol-BSA-Konjugates auf die polaren Eigenschaften des T-2 Tetraols zurück und vermuten, daß die vier Hydroxylgruppen mit Seitenketten im

Trägermolekül (BSA) Wasserstoffbrücken ausbilden und so die ursprüngliche Struktur des Toxins maskieren. Weitere Indizien für diese Theorie liefern die Arbeiten über die Gewinnung von Antiseren gegen Deoxyverrucarol (CHU et al., 1984b) auf der einen und die Ergebnisse der Versuche zur Produktion von Antikörpern gegen T-2 Tetraoltetraacetat (FAN et al., 1987) auf der anderen Seite. Gegen beide Toxine, sowohl das an C₃, C₄ und C₁₅ reduzierte T-2 Tetraol (= Deoxyverrucarol) als auch das an C₃, C₄, C₈ und C₁₅ acetylierte T-2 Tetraol (= T-2 Tetraoltetraacetat), ließen sich ohne Schwierigkeiten Antiseren gewinnen. Auf einen Zusammenhang zwischen hydrophiler Struktur und geringer Immunogenität bzw. auf gute Immunogenität von hydrophoben Acetylresten deuten auch die eigenen Untersuchungen zur Gewinnung von Antiseren gegen Fusarenon X hin. Gegen dieses Toxin, das Monoacetylderivat des Nivalenol, konnten in Kaninchen spezifische Antikörperspiegel induziert werden, die weit über dem beim Nivalenol erreichten maximalen Titer lagen. Ausgesprochen hohe Titer spezifischer Antikörper konnten dagegen bei der Immunisierung gegen die makrozyklischen Trichothecene Roridin A und Verrucarol A beobachtet werden. Dies spricht einerseits für die gute, den Aflatoxinen und Ochratoxin A ähnliche Immunogenität dieser Toxingruppe in Kaninchen und andererseits für die Stabilität der synthetisierten Toxin-HSA-Konjugate. Ein Verlust der Immunogenität des Hapten-Protein-Konjugates durch Dissoziation des Toxins vom Trägerprotein, wie sie für das T-2 Toxin-BSA-Konjugat beschrieben wurde (HUNTER et al., 1985) und vermutlich auf die Instabilität des verwendeten T-2 Toxin-Hemisuccinates zurückzuführen ist (ZHANG et al., 1986a), wurde nicht registriert.

Zu der zur Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter verwendeten Methode (3.2.1.5.2) bleibt zu bemerken, daß damit ein empfindliches Verfahren zur Verfügung steht, das allerdings nur eine Aussage über den relativen Gehalt an spezifischen Antikörpern erlaubt. Es können somit zwar Seren verschiedener Tiere verglichen und der Immunisierungsverlauf dargestellt werden, aber keine Angaben über den tatsächlichen Gehalt an spezifischen Antikörpern gemacht werden, weil dazu die Einbeziehung von genau charakterisierten Referenzseren nötig wäre (CAULFIELD und SHAFFER, 1984). Um Einflüsse durch die Affinitätsänderung der Antikörper während der Immunisierungsdauer auf die Titerbestimmung möglichst gering zu halten, wurde nach GRISWOLD und NELSON (1984) in dem in Abb. 18 dargestellten Verfahren das markierte Antigen im Überschuß eingesetzt.

4.4 Enzymimmunologische Nachweisverfahren

4.4.1 Durchführung

Zur Durchführung der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen wurden drei kompetitive Techniken eingesetzt. Neben dem direkten Enzymimmunotest für Aflatoxin M₁ und dem indirekten Verfahren zum Nachweis von Fusarenon X bewährte sich vor allem die doppelte Antikörpertechnik. Die vermutlich erste Beschreibung, die sich von der hier angewandten Methode mit Mikrotiterplatten als fester Phase lediglich durch die Verwendung von Polystyrolröhrchen unterscheidet, stammt von ARAKAWA et al. (1981). Eine entscheidende Verbesserung brachte der Vorschlag von MEYER und GÜVEN (1986), affinitätschromatographisch gereinigtes Antiserum als zweiten Antikörper zur Beschichtung der Mikrotiterplatten zu verwenden. Dadurch wird einerseits die IgG-Bindungskapazität der Festphase erhöht und andererseits die Reproduzierbarkeit der Resultate verbessert (MEYER, 1986). Ein nicht zu unterschätzender Nebeneffekt ist die Einsparung von Antiserum. So wurde beim Vergleich der Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M₁ mit dieser Methode etwa 80 % weniger Serum pro Test benötigt als im direkten kompetitiven Test, bei dem die Mikrotiterplatten mit dem spezifischen Antiserum beschichtet wurden. Die Angaben von MEYER und HOFFMANN (1987) bei einem Trenbolonnachweis liegen in der gleichen Größenordnung. Ein Nachteil der doppelten Antikörpertechnik ergibt sich dann, wenn sehr hohe Nachweisempfindlichkeiten gefordert sind, da durch die gleichzeitige Inkubation von spezifischem Antiserum, Probe und Enzymkonjugat die effektive Konzentration der nachzuweisenden Substanz im Test verringert wird. Für den Aflatoxin M₁-Nachweis^{*)} wurde deshalb das konsekutive Verfahren beibehalten.

^{*)} Der Entwurf (Stand 14. Nov. 1985) zur ersten Verordnung zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung sieht einen Grenzwert von 50 ng Aflatoxin M₁ im Liter Milch vor und einen Grenzwert von 10 ng Aflatoxin M₁ im Liter für Milch, die zur Herstellung von Säuglings- oder Kleinkindernahrung verwendet wird.

Prinzipiell bietet die doppelte Antikörpertechnik jedoch den Vorteil, daß die mit Anti-Kaninchen-IgG beschichteten Platten vorrätig gehalten und als Festphase für jeden Test eingesetzt werden können, bei dem das spezifische Antiserum in Kaninchen gewonnen wurde.

4.4.2 Empfindlichkeit

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit enzymimmunologischer Nachweisverfahren wurden erstmals von VAN WEEMEN und SCHUURS (1975) verschiedene heterologe Kombinationen von Antiserum und Enzymkonjugat verwendet. Die Autoren unterscheiden hierbei zwischen "hapten"-, "bridge"- und "site"-Heterologie und erreichten gerade mit den beiden ersten "Heterologietypen" deutliche Steigerungen der Empfindlichkeit von Verfahren zum Nachweis von Östrogenen. Zurückzuführen ist dieser Effekt auf eine unterschiedliche Affinität der Antiseren für das freie und das enzymmarkierte Hapten, da nach VAN WEEMEN und SCHUURS (1976) in der Regel das dem zur Immunisierung eingesetzten Hapten-Protein-Konjugat homologe Hapten-Enzym-Konjugat von den spezifischen Antikörpern stärker gebunden wird als das unmarkierte Hapten. Während dieser Effekt bei radioimmunologischen Verfahren mit tritiummarkierten Haptenanaloga keine Rolle spielt, zeigte sich die Bedeutung der zur Immunogensynthese in das Molekül eingeführten Brücke für die Affinität der resultierenden Antikörper auch bei einem Radioimmunoassay, bei dem das Hapten über dieselbe Brücke an ^{125}J -Histamin (als Tracer) und an den Proteinträger (zur Immunisierung) gebunden wurde (SCARISBRICK und CAMERON, 1975).

Die eigenen Untersuchungen ergaben für das "Hapten"-heterologe Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M_1 (Antiserum gegen Aflatoxin M_1 und Aflatoxin B_1 -HRP-Konjugat) lediglich eine geringe Verbesserung der Empfindlichkeit.

Deutlich gesteigert wurde die Empfindlichkeit des Enzymimmunotests zum Nachweis von Roridin A durch die Verwendung von Verrucarin A-Hemiglutarat-HRP als enzymmarkiertes Toxin. Da zur Immunogensynthese Roridin A-Dihemisuccinat, das an zwei verschiedenen Stellen an den Proteinträger gebunden sein kann (Abb. 17), eingesetzt wurde, liegt hier neben der "Hapten"- und "Brücken"-Heterologie möglicherweise auch eine "Seiten"-Heterologie vor.

Die umgekehrte Kombination von Antiserum gegen Verrucarin A und Roridin A-Dihemisuccinat-HRP ergab einen wesentlich unempfindlicheren Nachweis als das entsprechende homologe Verfahren. Ein Grund hierfür dürfte in der unterschiedlichen Spezifität der Antiseren liegen: so reagiert das Antiserum gegen Roridin A auch im homologen Test noch zu 15 % mit Verrucarin A, während das Antiserum gegen Verrucarin A eine Kreuzreaktion von weniger als 1 % mit Roridin A zeigt. Zu große Unterschiede der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion zwischen Antikörper und Antigen und der Reaktion zwischen Antikörper und markiertem Antigen können die Empfindlichkeit kompetitiver Enzymimmuntests jedoch deutlich reduzieren (EKINS et al., 1968). Dieses Ungleichgewicht dürfte auch die Sensitivität des heterologen Enzymimmuntests zum Nachweis von Fusarenon X nachteilig beeinflussen. Eine Empfindlichkeitssteigerung, wie sie für die Verwendung von "Markern" mit Brücken beschrieben wurde, die im Vergleich zum Immunogen zusätzliche Ringstrukturen wie Monosaccharide (HINDS et al., 1985) oder Glucuronide (CORRIE et al., 1981; MEYER und HOFFMANN, 1987) aufweisen, konnte durch die Einführung einer 4-Aminobenzoesäure-hydrazon-Brücke (Abb. 16) in das Fusarenon X-KLH-Konjugat (als Festphase für den indirekten Enzymimmuno-test) nicht erreicht werden.

Entscheidend für die Empfindlichkeit eines kompetitiven Immunoassays ist letztlich die Affinität der verwendeten Antiseren (PESCE et al., 1978). Diese kann durch die Inkubationsbedingungen beeinflusst werden, da sowohl die Entropie als auch die Enthalpie der Antigen-Antikörper-Reaktion temperaturabhängig ist, und die Triebkraft der Reaktion mit zunehmender Entropie und abnehmender Enthalpie größer wird (KUSS, 1984). Nach den Angaben desselben Autors erwiesen sich "Immunreaktionen zum Teil als überwiegend Enthalpie-getrieben, zum Teil als überwiegend Entropie-getrieben". Für Enthalpie-getriebene Systeme ist eine Zunahme der Reaktionsgleichgewichtskonstante bzw. eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit mit sinkenden Temperaturen zu erwarten, wie sie in den hier beschriebenen Testverfahren zum Teil beobachtet wurde (Tab. 18).

4.4.3 Spezifität

Die Spezifität von Antiseren gegen niedermolekulare Substanzen wird einerseits durch individuelle Unterschiede, auch bei genetisch verwandten Versuchstieren, und andererseits durch die Struktur des zur Immunisierung eingesetzten Hapten-Protein-Konjugates beeinflusst. So besteht lediglich für die Teile des Haptens, die über die hydratisierte Oberfläche des Proteinträgers hinausragen, eine Wahrscheinlichkeit, mit spezifischen Lymphozyten zu reagieren (PRATT, 1978). Dies führt, wie bereits von LANDSTEINER (1946) dargelegt wurde, zur Bildung von Antikörpern, die nur schwer Strukturen der Haptene "erkennen" können, die in der Nähe der Kopplungsstelle liegen.

Unterschiede in der Spezifität zweier Antiseren, die gegen ein identisches oder zumindest weitgehend ähnliches Hapten, das aber an gegenüberliegenden Stellen an den Proteinträger gebunden wurde - wie das bei der Immunisierung gegen Aflatoxin M₁ bzw. Aflatoxin B_{2α} der Fall war -, sind deshalb zu erwarten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Untersuchungen von HARDER und CHU (1979) und GAUR et al. (1981) stimmen dahingehend überein, daß für die Spezifität des Antiserums gegen Aflatoxin M₁ der Difurananteil und für die Spezifität des Antiserums gegen Aflatoxin B_{2α} der cumarin-ähnliche Teil des Moleküls ausschlaggebend ist (siehe auch Abb. 14). Zur Verdeutlichung sind in Abb. 42 die "Spezifitätsmuster" beider Antiseren gegenübergestellt.

Im Unterschied zu den bisher publizierten Arbeiten über die Gewinnung von Antiseren gegen Trichothecene der Gruppe A, wie T-2 Toxin (CHU et al., 1979), Diacetoxyscirpenol (CHU et al., 1984a), 3-Hydroxy-T-2 Toxin (WEI et al., 1986) und HT-2 Toxin (FAN et al., 1987), bei denen das Immunogen von der Hydroxygruppe an C₃ ausgehend synthetisiert gestartet wurde, wurden Nivalenol und Fusarenon X (Trichothecene der Gruppe B) von C₈ aus über eine Carboxymethyloxim-Brücke an den Proteinträger gebunden. Die Bedeutung der Kopplungsstelle für die Spezifität der resultierenden Antiseren zeigt sich hier in ähnlicher Weise wie bei den Aflatoxinen.

Während die Antiseren gegen die an C₃ gekoppelten Toxine hauptsächlich mit Trichothecenen reagierten, deren Struktur an Position C₈ mit der des Immuno-

gens übereinstimmte, zeigte sich in den Versuchen zur Charakterisierung der Antiseren gegen die Ketotrichothecene Nivalenol und Fusarenon X (Mono-acetylnivalenol) die Bedeutung der Reste an C₃, C₄ und C₁₅ (R₁, R₂ und R₃ in Abb. 33) für die Spezifität der immunologischen Reaktion. So reagiert das Antiserum gegen Nivalenol mit T-2 Tetraol, T-2 Triol und Scirpentriol und aufgrund dieses Spezifitätsrasters vermutlich mit weiteren Toxinen der Gruppe A, die an diesen Positionen hydroxyliert sind.

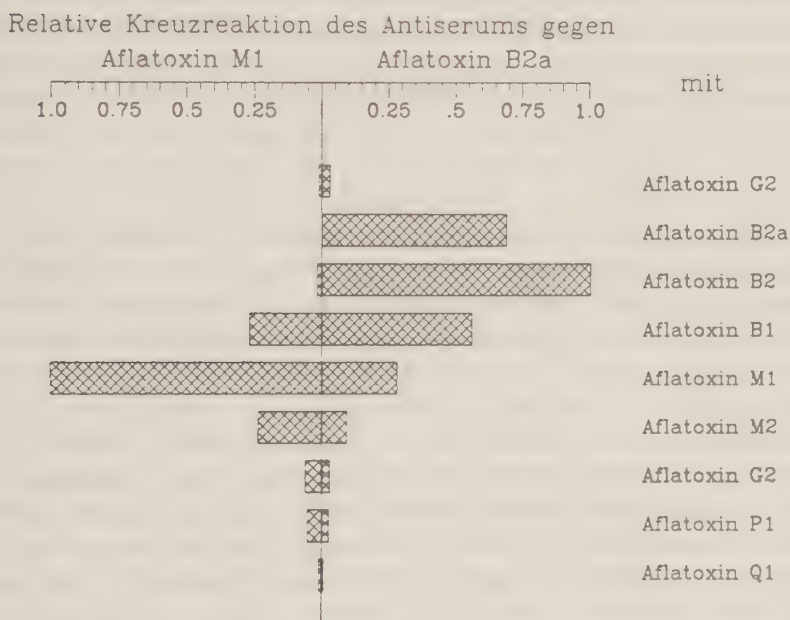


Abbildung 42: Spezifitätsmuster der Antiseren gegen Aflatoxin M₁ und Aflatoxin B_{2α}

Für das Antiserum gegen Fusarenon X ergibt sich ein ähnliches Bild, nur wird hier die Spezifität hauptsächlich von dem Acetylrest an C₄ geprägt, während eine Substitution der Hydroxygruppe an C₁₅ kaum Einfluß auf die Bindungsenergie der Antigen-Antikörper-Reaktion zu besitzen scheint. Aufgrund der guten Reaktivität dieses Antiserums mit T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol und Neosolaniol kommen als weitere kreuzreagierende

Trichothecene der Gruppe A und B alle die in Betracht, die an C₃ eine Hydroxygruppe und an C₄ einen Acetylrest besitzen. Darunter fallen neben Toxinen, die direkt von Fusarienarten gebildet werden, wie Diacetylnivalenol (LAUREN et al., 1987), auch Metabolite wie 3'Hydroxy-T-2 Toxin (YOSHIZAWA et al., 1982). Die besondere Rolle der Acetylgruppe an C₄ wird weiter durch die fehlende Kreuzreaktion mit Nivalenol und Deoxynivalenol, beides Trichothecene der Gruppe B, die sich lediglich an dieser Position von Fusarenon X unterscheiden (OH bzw. H anstelle von OCOCH₃), unterstrichen. Interessant ist auch das Ergebnis, daß T-2 Toxin von allen getesteten Trichothecenen am stärksten gebunden wird. Eine mögliche Erklärung wäre, daß T-2 Toxin durch den Isovalerylrest an C₈ dem Immunogen, d.h. dem über eine Carboxymethyloxim-Brücke an Humanserumalbumin gebundenen Fusarenon X, ähnlicher ist als Fusarenon X allein und deshalb mit dem Antikörper zusätzliche Bindungen ausbilden kann.

In den Versuchen zur Charakterisierung der Antiseren gegen die makrozyklischen Trichothecene Roridin A und Verrucarin A zeigte sich die Bedeutung der Kombination des Trichothecengrundgerüsts, das den getesteten Toxinen dieser Gruppe gemeinsam ist, mit dem makrozyklischen Ring für die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion. Während jedoch das Antiserum gegen Roridin A deutliche Kreuzreaktionen mit anderen makrozyklischen Trichothecenen zeigte, erwies sich das Antiserum gegen Verrucarin A im homologen Test als hochspezifisch für dieses Toxin. Dieses unterschiedliche Verhalten kann damit zusammenhängen, daß zur Kopplung von Verrucarin A an den Proteinträger eine Hemiglutarat-Brücke verwendet und so durch den größeren Abstand zum "Carrier" die Bildung von Antikörpern induziert wurde, die auch Strukturen des makrozyklischen Ringes in der Nähe der Kopplungsstelle erkennen. Bei der Kopplung des Dihemisuccinatderivates von Roridin A könnte andererseits dieser Teil des makrozyklischen Ringes vom Proteinträger maskiert sein, oder es wurde durch die wahrscheinlich an verschiedenen Stellen (s. a. Abb. 17) gebundenen Toxinmoleküle die Bildung einer heterogeneren Antikörperpopulation induziert. Insgesamt sind beide Antiseren sehr spezifisch für die makrozyklischen Trichothecene, da in praktisch relevanten Konzentrationsbereichen keines der nicht makrozyklischen Toxine gebunden wurde, so wie umgekehrt alle bis jetzt beschriebenen Antiseren gegen nicht makrozyklische Trichothecene (Tab. 5) keine Kreuzreaktion mit den makrozyklischen Toxinen zeigten. Lediglich ein

Antiserum gegen Deoxyverrucarol (CHU et al., 1984b) wies eine sehr geringe Reaktion mit Verrucarol A auf.

Die Spezifität des Verfahrens zum Nachweis von Ochratoxin A konnte nicht überprüft werden, da die als kreuzreagierende Moleküle in Frage kommenden Ochratoxine nicht zur Verfügung standen. Aufgrund der guten Übereinstimmung der eigenen Untersuchungen zur Spezifität der Antiseren gegen Aflatoxin M_1 und $B_{2\alpha}$ mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen können vermutlich hinsichtlich der Spezifität des Antiserums gegen Ochratoxin A die Resultate anderer Autoren zugrunde gelegt werden. Demzufolge würde der Test mit Ochratoxin A und C reagieren, aber nur geringe Kreuzreaktion mit Ochratoxin B und α aufweisen (CHU et al., 1976; PESTKA et al., 1981c).

Einflüsse auf die Spezifität durch Verkürzung der Inkubationszeit, wie sie von VINING et al. (1981) für Radioimmunoassays zum Nachweis von Steroidhormonen beschrieben wurden, konnten im Vergleich der beiden getesteten Zeitintervalle nicht festgestellt werden. Auch eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit ermöglichte keine Verbesserung hinsichtlich Empfindlichkeit und Spezifität (orientierende Untersuchungen, deren Ergebnisse nicht dargestellt wurden).

Ein negativer Einfluß der konsekutiven Testanordnung auf die Spezifität der immunologischen Reaktion, der sog. "first come, first served" Effekt (PRATT, 1978), konnte beim konsekutiven Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M_1 nicht festgestellt werden. Der konsekutive Test war sogar spezifischer als die simultane Testanordnung sowohl bei homologer als auch bei heterologer Kombination von Antiserum und Toxin-Enzym-Konjugat (Tab. 25). Besonders deutlich wird dies, wenn man die Kreuzreaktion des heterologen Testverfahrens mit Aflatoxin B_1 in simultaner (Spalte B II in Tab. 25) und konsekutiver (Spalte C II) Anordnung vergleicht. Im ersten Fall beträgt die Kreuzreaktion fast 100 %, im zweiten nur noch etwa 12 %. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten wären unterschiedliche Dissoziationsraten (siehe auch 2.2.1.2) des Immunkomplexes zwischen Aflatoxin M_1 bzw. Aflatoxin B_1 und dem Antikörper gegen Aflatoxin M_1 . Ist die Dissoziationsrate für den Aflatoxin B_1 -Antikörper-Komplex höher als die für den Aflatoxin M_1 -Antikörper-Komplex (bei etwa gleicher Assoziationsrate), kann im zweiten Schritt des konsekutiven Verfahrens jeder freie Antikörper eines dissoziierten Immun-

komplexes von Aflatoxin-Enzym-Konjugat belegt werden. Da in diesem zweiten Schritt der Testdurchführung keine freien Toxinmoleküle (außer den sehr geringen Mengen, die aus dem Antigen-Antikörper-Komplex freigesetzt werden) vorhanden sind, ist eine Rückreaktion nahezu ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu bleibt im simultanen Test die Konzentration an freiem und enzymmarkiertem Toxin gleich, so daß bei Dissoziation der Immunkomplexe die Bildung eines neuen Toxin-Antikörper-Komplexes genauso wahrscheinlich ist wie die Reaktion des Antikörpers mit dem enzymmarkierten Toxin. Bei ausreichender Reaktionsdauer wird sich ein Gleichgewicht einstellen, das von der Gleichgewichtskonstanten K der immunologischen Reaktion geprägt ist, während die Resultate des konsekutiven Verfahrens selbst geringe Unterschiede in der Dissoziationsrate widerspiegeln.

4.5 Anwendung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren

Neben genauen Kenntnissen über Empfindlichkeit und Spezifität enzymimmunologischer Methoden ist für deren praktische Anwendung die Entwicklung geeigneter Probenextraktions- und Aufbereitungsverfahren unerlässlich. Aufgrund der meist höheren Empfindlichkeit der immunologischen Verfahren im Vergleich zu den chemisch-physikalischen Methoden ist in der Regel eine Aufkonzentrierung des Probenmaterials nicht nötig. Da jedoch eine unspezifische Beeinflussung der Antigen-Antikörper-Reaktion nicht auszuschließen ist, kann durch eine geeignete Aufarbeitung des Probenmaterials die Sicherheit der ermittelten Resultate deutlich gesteigert werden. Bei enzymimmunologischen Verfahren muß außerdem berücksichtigt werden, daß manche den Proben zugesetzten Konservierungsstoffe enzymhemmende Eigenschaften besitzen und so zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Im Idealfall, wenn die Empfindlichkeit des Enzymimmunotests deutlich über der geforderten Nachweisgrenze liegt, können flüssige Proben wie Milch direkt in ausreichender Verdünnung im Test angesetzt werden (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1987). Liegt jedoch die Toxinkonzentration im Probenmaterial in der Nähe der Nachweisgrenze der Standardkurve sollte die Probe einem Reinigungsschritt unterzogen werden.

In den hier beschriebenen Versuchen zur Bestimmung von Aflatoxin M_1 wurde ein "Clean-up" mit Sep-pak-Kartuschen in Anlehnung an die von WINTERLIN et al. (1979) beschriebene Methodik eingesetzt. Wie die in Tab. 8 aufge-

fürten Arbeiten zeigen, hat sich diese Art der Probenaufbereitung gerade für den enzymimmunologischen Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchprodukten bewährt. Der direkte Ansatz von Milch im enzymimmunologischen Test (PESTKA et al., 1981a) resultiert in einer Nachweisgrenze, die weit über dem in der Bundesrepublik Deutschland angestrebten Grenzwert von 50 ng Aflatoxin M₁ im Liter Milch liegt. Die von FREMY et al. (1984), HU et al. (1984) und JACKMAN (1985) beschriebenen Verfahren erreichen diese Nachweisgrenze, erfordern jedoch neben der Aufreinigung mit Sep-pak-Kartuschen einen zusätzlichen Konzentrierungsschritt, da die Empfindlichkeit dieser Enzymimmunoassays etwa eine Zehnerpotenz unter der des hier beschriebenen Tests liegt. Dieser Unterschied ist zum einen auf die höhere Affinität der eigenen Antiseren und zum anderen auf die konsekutive Testanordnung im Vergleich zu der von den zitierten Autoren gewählten simultanen zurückzuführen. Der Einfluß des heterologen Prinzips ist dagegen von untergeordneter Bedeutung.

Im Vergleich zur Dünnschichtchromatographie, der zum Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchprodukten am häufigsten eingesetzten Methode (APPLEBAUM et al., 1982), liegen die Vorteile des enzymimmunologischen Verfahrens in der Arbeits- und Zeitersparnis bei der Probenaufbereitung und dem geringen Verbrauch an organischen Lösungsmitteln. Während für die dünnschichtchromatographische Untersuchung nach einer amtlichen Methode *) ca. 440 ml an organischen Lösungsmitteln verbraucht werden und an einem Tag von einer Arbeitskraft nur etwa vier Proben untersucht werden können, erlaubt die hier beschriebene Methode die Untersuchung von bis zu vierzig Proben täglich bei einem Verbrauch von nur 15 ml Lösungsmittel je Probe.

Wegen der hohen Affinität von Ochratoxin A für Serumproteine (CHU, 1971; CHU, 1974) kann dieses Toxin erst nach Extraktion aus dem Serum nachgewiesen werden. Im Anschluß an die Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel mußte der Extrakt durch Umschütteln in Bicarbonatlösung gereinigt werden, um eine unspezifische Beeinflussung des Testsystems durch

*) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (Nov. 1982), 01.00-14 ("Schuller"-Methode)

die Probenmatrix zu vermeiden. Diese Aufarbeitung der Serumproben erfolgte in Anlehnung an Methoden, die für den Nachweis mittels HPLC eingesetzt werden (HULT et al., 1979; BAUER et al., 1984). Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des enzymimmunologischen Verfahrens konnten ohne Aufkonzentrierung der Proben noch 0,5 µg Ochratoxin A im Liter Serum nachgewiesen werden, so daß der Nachweis dieses Toxins auch aus sehr kleinen Probenvolumina geführt werden kann. Der Einsatz dieses Verfahrens zur Untersuchung anderer Proben, wie Schweinenieren, aber auch Zerealien, auf Ochratoxin A dürfte nach den Untersuchungen - mit einem indirekten Enzymimmunoassay - von MORGAN et al. (1983 und 1986b) in ähnlich einfacher Weise möglich sein. Ein Vorteil gegenüber dem physikalisch-chemischen Verfahren ergibt sich bei der Bewältigung hoher Probenzahlen, da mit dem immunologischen Verfahren, wenn es in Mikrotiterplatten angesetzt wird, gegenüber der für die HPLC vorgegebenen sequentiellen Analytik eine parallele Analyse von Proben in einem Arbeitsgang möglich ist.

Mit dem enzymimmunologischen und dem physikalisch-chemischen Verfahren stehen zwei Methoden zur Bestimmung von Ochratoxin A zur Verfügung, die, da sie auf völlig unterschiedlichen Detektionsprinzipien beruhen, ideal zur gegenseitigen Absicherung von Ergebnissen eingesetzt werden können. So konnten Spuren von Ochratoxin A in Muttermilch, die mittels HPLC detektiert wurden, mit dem hier beschriebenen Enzymimmunotest qualitativ bestätigt werden (GAREIS et al., 1988).

Der Einsatz analytischer Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs setzt genaue Kenntnisse über Resorption, Metabolismus und Ausscheidung dieser mit der Nahrung aufgenommenen Stoffe voraus. Nach dem derzeitigen Wissensstand sind der Nachweis von Aflatoxin M₁ in der Milch und die Untersuchung von Schweinefleischprodukten auf Ochratoxin A die vordringlichsten Aufgaben dieses Bereichs der Lebensmittelhygiene. Die Bedeutung anderer Mykotoxinrückstände, wie etwa Metabolite der Trichothecene ist mangels Untersuchungen über Vorkommen und Toxizität noch nicht abzuschätzen. Während somit die Problemstellung bei den Aflatoxinen und Ochratoxinen relativ scharf umrissen ist, wird gerade die Analytik von Trichothecenrückständen in tierischen Produkten durch die Vielzahl der allein bis jetzt bekannten Metabolite erschwert. Mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen enzymimmunologischen Verfahren zum Nach-

weis von Nivalenol und Fusarenon X können zumindest einige der Hauptmetabolite des T-2 Toxins, wie T-2 Tetraol, 3'Hydroxy-T-2 Toxin und Neosolarinol (YOSHIZAWA et al., 1984), und des Diacetoxyscirpenols, wie Scirpentriol (BAUER et al., 1985), erfaßt werden. Die hohe Kreuzreaktivität des Antiserums gegen Nivalenol mit T-2 Tetraol und Scirpentriol ergibt einen weiteren Aspekt für die künftigen Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens: da sich die meisten Trichothecene der Gruppe A durch einfache Hydrolyse auf diese beiden Grundstrukturen zurückführen lassen (WEI et al., 1971), könnte, wenn man diesen Hydrolyseschritt in die Probenaufbereitung einbezieht, mit diesem Test eine Summenbelastung von Lebensmitteln mit Trichothecenrückständen erfaßt werden. Der Enzymimmunotest zum Nachweis von Fusarenon X könnte daneben Bedeutung in der Untersuchung von Futtermitteln erlangen, ebenso die Verfahren zum Nachweis makrozyklischer Trichothecene.

Die Vorteile Immunologischer Nachweisverfahren, wie Schnelligkeit, einfache Durchführbarkeit, Automatisierbarkeit und die daraus resultierende Kosteneffektivität, lassen diese Methoden besonders als "Screening"-Verfahren zur Bewältigung großer Probenumfänge geeignet erscheinen. Obwohl in den eigenen Untersuchungen zur Anwendung der enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M₁ und Ochratoxin A keine falsch positiven Ergebnisse beobachtet wurden, ist eine Beeinflussung der Testsysteme durch kreuzreagierende Substanzen oder das Auftreten unspezifischer Effekte durch die Probenmatrix nicht auszuschließen. Eine Absicherung enzymimmunologischer Befunde durch Referenzverfahren ist deshalb zumindest für gerichtliche und amtliche Zwecke unerlässlich. Immunologische und chemisch-physikalische Nachweisverfahren könnten sich somit in idealer Weise ergänzen, sei es als unabhängige Methoden zur gegenseitigen Absicherung von Ergebnissen oder als kombinierte Verfahren. So verbindet z. B. die Kopplung von HPLC und Immunoassay die hohe Selektivität des chemisch-physikalischen mit der Sensitivität des immunologischen Verfahrens und bietet die Möglichkeit, auch noch sehr geringe Stoffkonzentrationen mit großer Spezifität nachzuweisen (GAULT et al., 1985).

Der serologische Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln (tierischen Ursprungs), eventuell auch in Futtermitteln, wäre somit eine sinnvolle Ergänzung dieses analytischen Bereichs der Lebensmittelhygiene bzw. anderer Bereiche der Veterinärmedizin. Insbesondere enzymimmunologische Verfahren, die heute schon an vielen Veterinäruntersuchungsinstituten im Rahmen der Seuchendiagnostik, z.T. auch schon für den Nachweis von Hormonrückständen und in absehbarer Zeit von Antibiotikarückständen, eingesetzt werden, könnten hier einen wesentlichen Beitrag zu einem effizienteren Schutz des Verbrauchers leisten.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen unter besonderer Berücksichtigung der Lebensmittel tierischen Ursprungs. Dazu mußten einerseits spezifische Antiseren gewonnen und andererseits die Toxine mit einem Enzym markiert werden. Da die niedermolekularen Mykotoxine per se nicht immunogen wirksam sind, wurden sie vor der Immunisierung an ein Trägerprotein gebunden.

Nach Derivatisierung von Aflatoxin M₁, Nivalenol und Fusarenon X mit Carboxymethoxylamin bzw. unter Verwendung von Roridin A-Hemisuccinat und Verrucarín A-Hemiglutarat konnten immunogene Toxin-Protein-Konjugate synthetisiert werden. Mit der Carbodiimidmethode wurden vier Moleküle Aflatoxin M₁-Oxim an ein Molekül Humanserumalbumin (HSA) gebunden, während durch die Verwendung aktiver Ester als reaktive Zwischenprodukte bei der Herstellung der Trichothecen-HSA-Konjugate Kopplungsraten von 18 bzw. 15 : 1 für Roridin A- bzw. Verrucarín A-HSA erzielt wurden. Ochratoxin A und Aflatoxin B_{2α} wurden direkt mittels der gemischten Anhydridmethode bzw. durch reduktive Alkylierung in einem Verhältnis von 28 : 1 bzw. 10 : 1 an das Trägerprotein gebunden.

Die Toxin-Protein-Konjugate (225-300 µg/Tier) wurden Gruppen von drei bis vier Kaninchen intracutan appliziert. Die Restimmung erfolgte in der Regel mit der gleichen Konjugatmenge subcutan oder intramuskulär. Mit diesem Immunisierungsschema konnten spezifische Antiseren gegen Aflatoxin M₁ und B_{2α}, Ochratoxin A, Nivalenol, Fusarenon X, Roridin A und Verrucarín A gewonnen werden.

Zur Kopplung der Toxine bzw. der Toxinderivate an Meerrettichperoxidase bewährte sich die aktive Estermethode. Die enzymatische Restaktivität der Toxin-Enzym-Konjugate lag zwischen 55 und 85 %.

Als Nachweisgrenze der Verfahren zur Bestimmung von Aflatoxin M₁, B_{2α}, Ochratoxin A, Nivalenol, Fusarenon X, Roridin A und Verrucarín A wurden Toxinkonzentrationen von 0,041; 0,17; 0,22; 60,0; 0,3; 3,0 bzw. 0,2 ng/ml ermittelt. Diese Ergebnisse wurden unter Verwendung eines direkten simul-

tanen Verfahrens mit affinitätschromatographisch gereinigtem Antiserum gegen Kaninchen IgG als Festkörperphase und homologer Kombination von Antiserum und enzymmarkiertem Toxin erzielt. Durch die Verwendung heterologer Kombinationen bzw. durch Inkubation bei 4 °C konnte in einigen Fällen die Nachweisgrenze verbessert werden.

Zur Bestimmung der Spezifität wurde der Einfluß strukturähnlicher Toxine auf die Testsysteme geprüft. Das enzymimmunologische Verfahren zum Nachweis von Aflatoxin M₁ reagierte zu 100, 29 bzw. 26 % mit Aflatoxin M₁, B₁ und M₂ und dasjenige zum Nachweis von Aflatoxin B_{2α} zu 100, 148, 81 bzw. 43 % mit Aflatoxin B_{2α}, B₂, B₁ und M₁. Das Antiserum gegen Nivalenol reagierte mit Nivalenol (100 %), T-2 Triol (471 %), Scirpentriol (51 %) und T-2 Tetraol (28 %), während Fusarenon X (100 %), T-2 Toxin (360 %), Diacetoxyscirpenol (119 %) und Neosolaniol (49 %) von dem Antiserum gegen Fusarenon X gebunden wurden. Der Enzymimmunotest zum Nachweis von Roridin A erwies sich als spezifisch für makrozyklische Trichothecene mit Kreuzreaktionen von 40, 15 bzw. 14 % für Roridin J, Verrucaridin A und Satratoxin H im Vergleich zu Roridin A. Das Antiserum gegen Verrucaridin A zeigte sich dagegen hochspezifisch für dieses Toxin. Die Verwendung heterologer Kombinationen von Antiserum und Toxin-Enzym-Konjugaten zeigte meist einen negativen Einfluß auf die Spezifität der Testsysteme.

Zum Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver wurde das Toxin mit Einmalkartuschen aus der flüssigen Probenmatrix extrahiert. Mit dieser Methode konnten noch 2,5 ng Aflatoxin M₁ im Liter nachgewiesen werden. Die Wiederfindungsraten für Toxingehalte zwischen 5 und 30 ppt lagen bei 94 %.

Zur Bestimmung von Ochratoxin A in Schweineserum wurden die Proben nach Ansäuerung mit Dichlormethan extrahiert und der Extrakt über Bicarbonat gereinigt. Die Nachweisgrenze der Methode lag unter 0,5 ppb mit Wiederfindungsraten von ca. 73 % für Proben mit Toxingehalten von 0,5-5,0 ng/ml.

Die Verwendung eines Personal Computers und eines selbstentwickelten Programms zur Erfassung und Bearbeitung der Meßwerte ermöglichte die schnelle und genaue Auswertung der enzymimmunologischen Nachweisverfahren. Die Anpassung der Standardkurve an die Datenpunkte erfolgt dabei mittels "Splinesapproximation".

Summary

Studies on the development of enzyme immunoassays for the detection of mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A, and trichothecenes) in food

This paper describes the development and application of enzyme immunoassays for the assessment of mycotoxins with special reference to food of animal origin. For this purpose specific antibodies had to be prepared as well as enzyme labelled toxins. Since Mycotoxins are substances of low molecular weight, they are not immunogenic and must be conjugated to a protein carrier before immunization.

Immunogenic toxin-protein-conjugates were synthesized using carboxy-methoxylamine derivatives of aflatoxin M_1 , nivalenol, and fusarenol X, and hemisuccinate and hemiglutarate derivatives of roridin A and verrucarol A, respectively. Four molecules of aflatoxin M_1 -oxime were bound per molecule of human serum albumin (HSA) using the carbodilimide procedure, whereas 18 and 15 molecules of roridin A and verrucarol A were bound to the carrier protein by using activated esters as reactive intermediates for the preparation of the trichothecene-HSA-conjugates. Ochratoxin A and aflatoxin $B_{2\alpha}$ were coupled directly to HSA by using a mixed anhydride procedure and a reductive alkylation method, respectively. The resulting toxin/carrier ratio was 28 : 1 for ochratoxin A-HSA and 10 : 1 for aflatoxin $B_{2\alpha}$ -HSA.

The toxin-protein conjugates (225-300 μg per animal) were given intradermally to groups of three to four rabbits. The animals were reimmunized subcutaneously or intramuscularly usually with the same amount of the conjugate. Using this immunization schedule specific antisera against aflatoxin M_1 , $B_{2\alpha}$, ochratoxin A, nivalenol, fusarenol X, roridin A, and verrucarol A could be prepared.

The activated ester method was found to be adequate for coupling the toxins or their derivatives to horseradish peroxidase. The remaining catalytic activity of the toxin-enzyme-conjugates was between 55 and 85 %.

The detection limit for the assessment of aflatoxin M_1 , $B_{2\alpha}$, ochratoxin A, nivalenol, fusarenol X, roridin A, and verrucarol A was found at 0.041, 0.17,

0.22, 60.0, 0.3, 3.0, and 0.2 ng/ml, respectively. These results were obtained using a direct simultaneous assay with antiserum against rabbit IgG, purified by affinity chromatography, as the solid phase and homologous combinations of antiserum and enzyme labelled toxin. In some cases detection limit was improved using heterologous combinations or a incubation step at 4 °C.

To check specificity toxins similar in structure were tested under the conditions of the enzymimmunoassay. The aflatoxin M₁ assay showed relative reactivities of 100, 29, and 26 % for aflatoxin M₁, B₁, and M₂, respectively. The aflatoxin B_{2α} assay was specific for aflatoxin B_{2α}, B₂, B₁, and M₁ with relative reactivities of 100, 148, 81, and 43 %, respectively. The antiserum against nivalenol showed reactivity towards nivalenol (100 %), T-2 triol (471 %), scirpenetriol (51 %), and T-2 tetraol (28 %), whereas fusarenon X (100 %), T-2 toxin (360 %), diacetoxyscirpenol (119 %), and neosolaniol (49 %) were bound by the antibody against fusarenon X. The assay for the detection of roridin A was specific for the macrocyclic trichothecenes, and the relative reactivities for roridin J, verrucarín A, and satratoxin H were, respectively, 40, 15, and 14 % of that found for roridin A. In contrast the antiserum against verrucarín A was specific only for verrucarín A. In most cases assay specificity was reduced, if a heterologous combination of antiserum and enzyme labelled toxin was used.

For the assessment of aflatoxin M₁ in milk and powdered milk the toxin was extracted by using disposable cartridges. The detection limit was below 2.5 ng/l. Recovery for aflatoxin M₁ in the range of 5 to 30 ng/l was about 94 %.

For the determination of ochratoxin A in porcine blood serum the samples were acidified, extracted with dichlormethane, and the extracts purified by using a bicarbonate clean-up step. The detection limit of the method was 0.5 ng/ml and the average recovery rate, tested in the range between 0.5 and 5.0 ng/ml was found to be 73 %.

Rapid and accurate immunoassay data processing was facilitated by a personal computer and a program for data capturing and processing. The selfmade PASCAL routine utilizes "spline approximation" for curve fitting.

AALUND, O., K. BRUNFELD, B. HALD, P. KROGH und K. POULSEN (1975):
A radioimmunoassay for ochratoxin A: a preliminary investigation
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C 83, 390-392

ABRAHAM, G. E. (1974):
Characterization of anti-steroid antisera
in: CAMERON, E. D. H., S. G. HILLIER und K. GRIFFITH: Steroid immunoassays
proceedings of the 5th Tenovus Workshop, p. 67-78
Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales

ALLCROFT, R. und R. B. A. CARNAGHAN (1963):
Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from
animals fed toxic groundnut meal
Veterinary Record 75, 259-263

ALLCROFT, R., H. ROGERS, G. LEWIS, J. NABNEY und P. E. BEST (1966):
Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the 'milk toxin'
Nature 209, 154-155

ALPERT, M. E., M. S. R. HUTT, G. N. WOGAN und C. S. DAVIDSON (1971):
Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in
Uganda
Cancer 28, 253-260

AMES, B. N., W. E. DURSTON, E. YAMASAKI und F. D. LEE (1973):
Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates
for activation and bacteria for detection
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2281-2285

APPLEBAUM, R. S., R. E. BRACKETT, D. W. WISEMAN und E. H. MARTH (1982):
Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk
products - a review
J. Food Protection 45, 752-777

ARAKAWA, H., M. MAEDA, A. TSUJI und A. KAMBEGAWA (1981):
Chemiluminescence enzyme immunoassay of dehydropiandrosterone and its
sulfate using peroxidase as label
Steroids 38, 453-464

ASHOOR, S. H. und F. S. CHU (1975):
Interaction of aflatoxin B₂α with amino acids and proteins
Biochem. Pharmacol. 24, 1799-1805

- BAMBURG, J.R., und F. M. STRONG (1971):
12,13-Epoxytrichothecenes
in: KADIS, S., A. CIEGLER und S. AJL: Microbial Toxins, vol. 7, p. 207-292
Academic Press, Inc., New York
- BAUER, J., und M. GAREIS (1987):
Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette
J. Vet. Med. B 34, 613-627
- BAUER, J., M. GAREIS, und B. GEDEK (1984):
Zum Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A bei Schlachtschweinen
Berl. Münch. Tierärztl. Wsch. 97, 279- 283
- BAUER, J., W. BOLLWAHN, M. GAREIS, B. GEDEK und K. HEINRITZI (1985):
Kinetik profiles of diacetoxyscirpenol and two of its metabolites in blood
serum of pigs
Appl. Environ. Microbiol. 49, 842-845
- BAUMINGER, S. und M. WILCHEK (1980):
The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates
Meth. Enzymol. 70, 151-159
- BIERMANN, A. und G. TERPLAN (1980):
Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA
Archiv Lebensmittelhyg. 31, 51-57
- DIESELBEN (1982):
Erfahrungen mit einem Mikro-ELISA zur Aflatoxin B₁ Bestimmung in
Lebensmitteln
Archiv Lebensmittelhyg. 33, 17-20
- BODANSKY, M. (1984):
Principles of peptide synthesis
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokio
- BÖHNER, B. und C. TAMM (1966):
Die Konstitution von Roridin A
Helv. Chim. Acta 49, 2527-2546
- BRANDON, D. L., J. W. CORSE, J. J. WINDELE und L. L. LAYTON (1985):
Two homogeneous immunoassays for pyridoxamine
J. Immunol. Meth. 78, 87-94

BRIAN, P. W. und J. C. MCGOWAN (1946):

Biologically active metabolic products of the mould *Metarrhizium glutinosum*
S. pope

Nature 157, 334

BÜCHI, G., D. SPITZER, S. PAGLIA LUNGA und G. N. WOGAN (1973):

Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P₁

Life Sci. 13, 1143-1149

BÜCHI, G., D. M. FOULKES, M. KURONO, G. F. MITSCHELL und R. S. SCHNEIDER
(1967):

The total synthesis of racemic aflatoxin B₁

J. Am. Chem. Soc. 89, 6745-6753

BUSAM, L. und G. G. HABERMEHL (1982):

Accumulation of mycotoxins by *Baccharis coridifolia*: a reason for livestock
poisoning

Naturwissenschaften 69, 392-393

CAMPBELL, T. C. (1977):

In: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN: Mycotoxins in
human and animal health, p. 687-698

Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois

CAMPBELL, T. C. und J. R. HAYES (1976):

The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion

Toxicol. Appl. Pharmacol. 35, 199-222

CANDLISH, A. A. G., W. H. STIMSON und J. E. SMITH (1985):

A monoclonal antibody to aflatoxin B₁: detection of the mycotoxin by enzyme
immunoassay

Let. Appl. Microbiol. 1, 57-61

DIESELBEN (1986):

A monoclonal antibody to ochratoxin A

Let. Appl. Microbiol. 3, 9-11

CANTON, J. H., R. KROES, M. J. VAN LOGTEN, M. VAN SCHOTHORST, J. F. C.
STAVENUITER und C. A. H. VERHÜLSDONK (1975):

The carcinogenicity of aflatoxin M₁ in rainbow trout

Fd Cosmet. Toxicol. 13, 441-443

CARLBORG, F. W. (1979):

Cancer, mathematical models and aflatoxin

Fd Cosmet. Toxicol. 17, 159-166

CARNAGHAN, R. B. A., R. D. HARTLEY und J. O'KELLY (1963):
Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins
Nature 200, 1101

CAULFIELD, M. J. und D. SHAFFER (1984):
A computer program for the evaluation of ELISA data obtained using an
automated microtiter plate absorbance reader
J. Immunol. Meth. 74, 205-215

CHATTERJEE, K., P. J. PAWLOWSKY, L. TREEFUL und C. J. MIROCHA (1986):
Kinetic study of T-2 toxin metabolites in a cow
J. Food Safety 8, 25-34

CHI, M. S., T. S. ROBISON, C. J. MIROCHA und K. R. REDDY (1978):
Acute toxicity of 12,13-epoxytrichothecenes in one-day-old broiler chicks
Appl. Environ. Microbiol. 35, 636-640

CHU, F. S. (1971):
Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin
Arch. Biochem. Biophys. 147, 359 - 366

DERSELBE (1974):
A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum
albumin
Biochem. Pharmacol. 23, 1105 - 1113

DERSELBE (1984):
Immunoassays for analysis of mycotoxins
J. Food Protection 47, 562 - 569

DERSELBE (1985):
Recent studies on immunochemical analysis of mycotoxins
in: STEYN, P. S. und R. VLEGGAAR: Mycotoxins and phycotoxins, p. 277-292
Elsevier Science Publ. B. V. Amsterdam

CHU, F. S. und I. UENO (1977):
Production of antibody against aflatoxin B₁
Appl. Environ. Microbiol. 33, 1125-1128

CHU, F. S., F. C. C. CHANG und R. D. HINS DILL (1976):
Production of antibody against ochratoxin A
Appl. Environ. Microbiol. 31, 831-835

CHU, S. F., M.-T. S. HSIA und P. S. SUN (1977):
Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-(O-carboxymethyl) oxime
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 791-794

- CHU, F. S., M. Y. C. LIANG und G. S. ZHANG (1984a):
Production and characterization of antibody against diacetoxyscirpenol
Appl. Environ. Microbiol. 48, 777-780
- CHU, F. S., B. W. STEINERT und P. K. GAUR (1985):
Production and characterization of antibody against Aflatoxin G₁
J. Food Safety 7, 161-170
- CHU, F. S., S. GROSSMAN, R.-D. WEI und C. J. MIROCHA (1979):
Production of antibody against T-2 toxin
Appl. Environ. Microbiol. 37, 104-108
- CHU, F. S., G. S. ZHANG, M. D. WILLIAMS und B. B. JARVIS (1984b):
Production and characterization of antibody against deoxyverrucarol
Appl. Environ. Microbiol. 48, 781-784
- COLE, R. J. und R. H. COX (1981):
Handbook of toxic fungal metabolites
Academic Press New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco
- CORLEY, R. A., S. P. SWANSON und W. B. BUCK (1985):
Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine bile and urine
J. Agric. Food Chem. 33, 1085-1089
- CORLEY, R. A., S. P. SWANSON, G. J. GULLO, L. JOHNSON, V. R. BEASLEY und
W. B. BUCK (1986):
Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in intravascularly dosed
swine
J. Agric. Food Chem. 34, 868-875
- CORRIE, J. E. T., W. M. HUNTER und J. S. MACPHERSON (1981):
A strategy for radioimmunoassay of plasma progesterone with use of a
homologous-site ¹²⁵J-labeled radioligand
Clin. Chem. 27, 594-599
- COTE, L.-M., J. NICOLETTI, S. P. SWANSON und W. B. BUCK (1986):
Production of deepoxydeoxynivalenol (DOM-1), a metabolite of
deoxynivalenol, by in vitro rumen incubation
J. Agric. Food Chem. 34, 458-460
- CROFT, W. A., B. B. JARVIS und C. S. YATAWARA (1986):
Airborne outbreak of trichothecene toxicosis
Atmos. Environ. 20, 549-552

- DAHMS, R. und H. L. GURTOO (1976):
Metabolism of aflatoxin B₁ to aflatoxins Q₁, M₁ and P₁ by rat and mouse
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 15, 11-20
- DALEZIOS, J. I., D. P. H. HSIEH und G. N. WOGAN (1973):
Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin B₁ by Rhesus
monkeys
Fd Cosmet. Toxicol. 11, 605-616
- DE IONGH, H., R. O. VLES und J. G. VAN PELT (1964):
Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet
Nature 202, 466-467
- DETROY, R. W. und C. W. HESSELTINE (1968):
Isolation and biological activity of a microbial conversion product of
aflatoxin B₁
Nature 219, 967
- DIXON, D. E., R. L. WARNER, B. P. RAM, L. P. HART und J. J. PESTKA (1987):
Hybridoma cell line production of a specific monoclonal antibody to the
mycotoxins zearalenone and α -zearalenol
J. Agric. Food Chem. 35, 122-126
- DWENGER, A. (1984):
Radioimmunoassay: an overview
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 883-894
- EIGEN, M. (1974):
Diffusion control in biochemical reactions
in: MINTZ, S. L. und S. M. WIEDERMAYER: Quantum statistical mechanics in
the nature sciences, p. 37-61
Plenum Press New York
- EISELE, T. A., P. M. LOVELAND, D. L. KRUK, T. R. MEYERS, J. E. NIXON und
R. O. SINNHUBER (1982):
Rabbit hepatic in vitro metabolism of aflatoxin B₁ and aflatoxicol, and the
effects of dietary cyclopropenoid fatty acids
Fd Cosmet. Toxicol. 20, 407
- EKINS, R. P., G. B. NEWMAN und J. L. H. O'RIORDAN (1968):
Theoretical aspects of "saturation" and radioimmunoassay
in: HAYES, R. L., F. A. GOSWITZ und B. E. P. MURPHY: Radioisotops in
medicine: in vitro studies
U. S. Atomic Energy Commission, Oak Ridge, Tenn.
zit. n. HINDS et al. (1985)

EL-NAKIB, O., J. J. PESTKA und F. S. CHU (1981):

Determination of aflatoxin B₁ in corn, wheat and peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay and solid phase radioimmunoassay
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 1077-1082

ENGVAL, E. (1980):

Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT
Meth. Enzymol. 70, 419-439

EPPLEY, R. M. (1977):

Chemistry of stachybotryotoxicosis

In: Rodricks, J. V., C. W. Hesseltine und M. A. Mehlman: Mycotoxins in human and animal health, p. 285-293

Pathotox Publishers Inc., Park Forest South, Illinois

ERLANGER, B. F. (1980):

The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey
Meth. Enzymol. 70, 85-103

ERLANGER, B. F., F. BOREK, S. M. BEISER und S. LIEBERMAN (1957):

Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone

J. Biol. Chem. 228, 713-727

ESGIN, S. (1987):

Erstellung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von T-2 Toxin

Diss. med. vet. München

ESSIGMANN, J. M., R. G. CROY, A. M. NADZAN, W. F. BUSBY und G. N. WOGAN (1977):

Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ in vitro

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1870-1874

FALKENBERG, F. W., D. PIERARD, U. MAI und G. KANTWERK (1984):

Polyclonal and monoclonal antibodies as reagents in biochemical and in clinical-chemical analysis

J. Clin. Chem. Biochem. 22, 867-882

FAN, T. S. L. und F. S. CHU (1984):

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B₁ in corn and peanut butter

J. Food Protection 47, 263-266

FAN, T. S. L., G. S. ZHANG und F. S. CHU (1984a):

Production and characterization of antibody against aflatoxin Q₁

Appl. Environ. Microbiol. 47, 526-532

DIESELBEN (1984b):

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin in biological fluids

J. Food Protection 47, 964-967

DIESELBEN (1987):

Production and characterization of antibodies against HT-2 toxin and T-2 tetraol tetraacetate

Appl. Environ. Microbiol. 53, 17-21

FENTON, J. W. und S. J. SINGER (1971):

Affinity labeling of antibodies to the p-azophenyltrimethylammonium hapten, and a comparison of affinity-labeled antibodies of two different specificities

Biochemistry 10, 1429-1437

FREMY, J. M. und F. S. CHU (1984):

Direct enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ at picogram levels in dairy products

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 1098-1101

PROBISH, R. A., B. D. BRANDLEY, D. D. WAGNER, P. E. LONG-BRANDLEY und H. HAIRSTON (1986):

Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain

J. Food Protection 49, 781-785

FUKAL, L., J. PROSEK, P. RAUCH, Z. SOVA und J. KAS (1987):

Selection of the separation step in the radioimmunoassay for aflatoxin B₁ using ¹²⁵I as a marker

J. Radioanal. Nucl. Chem. 109, 383-391

GALLATI, H. und I. PRACHT (1985):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der

Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GAREIS, M., E. MÄRTLBAUER, J. BAUER und B. GEDEK (1988):

Bestimmung von Ochratoxin A in Muttermilch

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186, 114-117

- GAULT, M. H., L. LONGERICH, M. DAWE und S. C. VASDEV (1985):
Combined liquid chromatography/radioimmunoassay with improved specificity
for serum digoxin
Clin. Chem. 31, 1272-1277
- GAUR, P. K., O. EL-NAKIB und F. S. CHU (1980):
Comparison of antibody production against aflatoxin B₁ in goats and rabbits
Appl. Environ. Microbiol. 40, 678-680
- GAUR, P. K., H. P. LAU, J. J. PESTKA und F. S. CHU (1981):
Production and characterization of aflatoxin B_{2α} antiserum
Appl. Environ. Microbiol. 41, 478-482
- GENDLOFF, E. H., J. J. PESTKA, S. P. SWANSON und L. P. HART (1984):
Detection of T-2 toxin in *Fusarium sporotrichoides*-infected corn by
enzyme-linked immunosorbent assay
Appl. Environ. Microbiol. 47, 1161-1163
- GENDLOFF, E. H., J. J. PESTKA, D. E. DIXON und L. P. HART (1987):
Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong
cross-reactivity to T-2 metabolites
Phytopathology 77, 57-59
- GENDLOFF, E. H., W. L. CASALE, B. P. RAM, J. H. TAI, J. J. PESTKA und L. P.
HART (1986):
Hapten-protein conjugates prepared by the mixed anhydride method
J. Immunol. Meth. 92, 15-20
- GOODFRIEND, T. L., L. LEVINE und G. D. FASMAN (1964):
Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in
Immunology
Science 144, 1344-1346
- GOTO, T. und D. P. H. HSIEH (1985):
Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered
¹⁴C-aflatoxin B₁
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 456-458
- GRISWOLD, W. R. und D. P. NELSON (1984):
Theoretical analysis of the Farr antibody assay with a computer model:
Importance of antigen concentration and antibody affinity
J. Immunoassay 5, 71-86

- GROOPMAN, J. D., L. J. TRUDEL, P. R. DONAHUE, A. MARSHAK-ROTHSTEIN und G. N. WOGAN (1984):
High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxins and their application to solid-phase immunoassays
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7728-7731
- HABERMEHL, G. G., L. BUSAM, P. HEYDEL, D. MEBS, C. H. TOKARNIA, J. DÖBEREINER und M. SPRAUL (1985):
Macrocyclic trichothecenes: cause of livestock poisoning by the brazilian plant *Baccharis coridifolia*
Toxicon 23, 731-745
- HACK, R., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1987):
A monoclonal antibody to the trichothecene T-2 toxin: screening for the antibody by a direct enzyme immunoassay
J. Vet. Med. B 34, 538-544
- HÄRRI, E., W. LOEFFLER, H. P. SIGG, H. STÄHELIN, CH. STOLL, CH. TAMM und D. WIESINGER (1962):
Über die Verrucarine und Roridine, eine Gruppe von cytostatisch hochwirksamen Antibiotica aus *Myrothecium*-Arten
Helv. Chim. Acta 98, 839-853
- HALFMAN, C. J. und A. S. SCHNEIDER (1981):
Optimization of reactant concentrations for maximizing sensitivities of competitive immunoassays
Anal. Chem. 53, 654-658
- HALVORSON, M. R., T. D. PHILLIPS, S. H. SAFE und L. W. ROBERTSON (1985):
Metabolism of aflatoxin B₁ by rat hepatic microsomes induced by polyhalogenated biphenyl congeners
Appl. Environ. Microbiol. 49, 882-886
- HARDER, W. O. und F. S. CHU (1979):
Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁
Experientia 35, 1104-1107
- HAUBECK, H. D., G. LORKOWSKI, E. KÖSCH und R. RÖSCHENTHALER (1981):
Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine
Appl. Environ. Microbiol. 41, 1040-1042
- HEBERT, G. A., P. L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):
Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera
Appl. Microbiol. 25, 26-36

HINDS, J. A., CH. F. PINCOMBE, ST. SMITH und P. DUFFY (1985):
The use of a monosaccharide linkage group in a heterologous solid-phase
immunoassay for phenytoin
J. Immunol. Methods 80, 239-253

HINTIKKA, E.-L. (1977):
Stachybotryotoxicosis as a veterinary problem
in: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN: Mycotoxins in
human and animal health, p. 277-284
Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois

HOLZAPFEL, C. W., P. S. STEYN und I. F. H. PURCHASE (1966):
Isolation and structure of aflatoxins M₁ and M₂
Tetrahedron Let. 25, 2799-2803

HSIEH, D. P. H. und B. H. RUEBNER (1984):
An assessment of cancer risk from aflatoxins B₁ and M₁
in: KURATA, H. und Y. UENO: Toxigenic fungi - their toxins and health
hazard, p. 332-338
Elsevier Science Publ. B. V., Amsterdam

HSIEH, D. P. H., A. S. SALHAB, J. J. WONG und S. L. YANG (1974):
Toxicity of aflatoxin Q₁ as evaluated with the chicken embryo and bacterial
auxotrophs
Toxicol. Appl. Pharmacol. 30, 237-242

HSIEH, D. P. H., Z. A. WONG, J. J. WONG, C. MICHAS und B. H. RUEBNER
(1977):
Comparative metabolism of aflatoxin
in: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN: Mycotoxins in
human and animal health, p. 37-50
Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois

HU, W. J., N. WOYCHIK und F. S. CHU (1984):
ELISA of picogram quantities of aflatoxin M₁ in urine and milk
J. Food Protection 47, 126-127

HULT, K., E. HÖKBY, U. HAGGLUND, S. GATENBECK, L. RUTQVIST und G.
SELLVEY (1979):
Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed
studies
Appl. Environ. Microbiol. 38, 772-776

HUMPHREY, J. H. und R. G. WHITE (1972):
Immunology for students of medicine (3rded.)
Blackwell Scientific Publ., Oxford

HUNTER, K. W., A. A. BRIMFIELD, M. MILLER, F. D. FINKELMAN und F. S. CHU
(1985):

Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the
trichothecene mycotoxin T-2

Appl. Environ. Microbiol. 49, 168-172

HURN, B. A. L. und S. M. CHANTLER (1980):

Production of reagent antibodies

Meth. Enzymol. 70, 104-135

JACKMAN, R. (1985):

Determination of aflatoxins by enzyme-linked immunosorbent assay with
special reference to aflatoxin M₁ in raw milk

J. Sci. Food Agric. 36, 685-698

JACKSON, T. M. und R. P. EKINS (1986):

Theoretical limitations on immunoassay sensitivity

J. Immunol. Methods 87, 13-20

JARVIS B. B., J. O. MIDIWO , D. TUTHILL und G. A. BEAN (1981):

Interaction between the antibiotic trichothecenes and the higher plant
Baccharis megapotamica

Science 214, 460-462

JARVIS, B. B., J. O. MIDIWO, J. L. FLIPPEN-ANDERSON und E. P. MAZZOLA
(1982):

Stereochemistry of the roridins

J. Nat. Prod. 45, 440-448

KABILKA, G. (1985):

Zum Nachweis von T-2 Toxin in Blutserum, Harn und Kot

Diss. med. vet. München

KAVERI, S. V., J.-M. FREMY, C. LAPEYRE und A. D. STROSBERG (1987):

Immunodetection and immunopurification of aflatoxins using a high affinity
monoclonal antibody to aflatoxin B₁

Let. Appl. Microbiol. 4, 71-75

KELLIE, A. E., K. V. LICHMAN und P. SAMARAJEEWA (1974):
Chemistry of steroid-protein conjugate formation
In: CAMERON, E. D. H., S. G. HILLIER und K. GRIFFITH: Steroid immunoassays
proceedings of the 5th Tenovus Workshop, p. 33-60
Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales

KIERMEIER, F. (1978):
Einführung in die Mykotoxin-Problematik
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 167, 115-127

DERSELBE (1985):
Das Mykotoxin-Problem: Ergebnisse der Lebensmittelüberwachung
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180: 389-393

KLAFFER, U., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1988):
Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the
detection of diacetoxyscirpenol
Int. J. Food Microbiol. 6, 9-17

KNUPP, C. A., ST. P. SWANSON und W. B. BUCK (1986):
In vitro metabolism of T-2 toxin by rat liver microsomes
J. Agric. Food Chem. 34, 865-868

KOHEN, F., S. BAUMINGER und H. R. LINDNER (1974):
Preparation of antigenic steroid-protein conjugates
In: CAMERON, E. D. H., S. G. HILLIER und K. GRIFFITH: Steroid immunoassays
proceedings of the 5th Tenovus Workshop, p. 11-31
Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales

KOHEN, F., M. PAZZAGLI, J. B. KIM und H. R. LINDNER (1980):
An immunoassay for plasma cortisol based on chemiluminescence
Steroids 36, 421-434

KROGH, P. (1977):
Ochratoxins
In: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN: Mycotoxins in
human and animal health, p. 489-498
Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois

KROGH, P., B. HALD, R. PLESTINA und S. CEOVIC (1977):
Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary
results of a survey of foodstuffs
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 85, 238-240

KURZER, F. und K. DOURAGHI-ZADEH (1967):
Advances in the chemistry of carbodiimides
Chem. Rev. 67, 107-152

KUSS, E. (1984):
Physikalisch-chemische Aspekte immunologischer und anderer reversibler
Assoziations-Reaktionen
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 851-865

LANDSTEINER, K. (1946):
Specificity of serological reactions
Harvard University Press, Cambridge, Mass.

LANGONE, J. J. und H. VAN VUNAKIS (1976):
Aflatoxin B₁: specific antibodies and their use in radioimmunoassay
J. Natl. Canc. Inst. 56, 591-595

LAU, H. P., P. K. GAUR und F. S. CHU (1981):
Aflatoxin B₂ α -Hemiglutarate and its use for the production of antibody
against Aflatoxin B₁
J. Food Safety 3, 1-13

LAUREN, D. R., A. ASHLEY, B. A. BLACKWELL, R. GREENHALGH, J. D. MILLER
und G. A. NEISH (1987):
Trichothecenes produced by *Fusarium crookwellense* DAOM 193611
J. Agric. Food Chem. 35, 884-889

LAWELLIN, D. W., D. W. GRANT und B. K. JOYCE (1977):
Enzyme-linked immunosorbent analysis for aflatoxin B₁
Appl. Environ. Microbiol. 34, 94-96

LEE, S. und F. S. CHU (1981a):
Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 156-161

DIESELBEN (1981b):
Radioimmunoassay of T-2 toxin in biological fluids
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 684-688

DIESELBEN (1984):
Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 45-49

LI, Y. K. und F. S. CHU (1984):
Production and characterization of antibody against sterigmatocystin
J. Food Safety 6, 119-127

LIGLER, F. S., R. BREDEHORST, A. TALEBIAN, L. C. SHRIVER, C. F. HAMMER, J. P. SHERIDAN, C.-W. VOGEL und B. P. GABER (1987):

A homogeneous immunoassay for the mycotoxin T-2 utilizing liposomes, monoclonal antibodies, and complement

Anal. Biochem. 163, 369-375

LIN, J., J. A. MILLER und E. C. MILLER (1977):

2,3-dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B₁-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome mediated reactions and in rat liver in vivo

Cancer Res. 37, 4430-4438

LIU, M.-T., B. P. RAM, L. P. HART und J. J. PESTKA (1985):

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone

Appl. Environ. Microbiol. 50, 332-336

LOVELAND, P. M., R. A. COULOMBE, L. M. LIBBEY, N. E. PAWLOWSKI, R.O.

SINNHUBER, J. E. NIXON und G. S. BAILEY (1983):

Identification and mutagenicity of aflatoxicol-M₁ produced by metabolism of aflatoxin B₁ and aflatoxicol by liver fractions from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed β -naphthoflavone

Fd Cosmet. Toxicol. 21, 557-562

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL (1951):

Protein measurement with the Folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275

LÖTTER, L. H. und J. C. SCHABORT (1983):

The effect of aflatoxins on mammalian acid deoxyribonucleases

Int. J. Biochem. 15, 817-825

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):

Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver

Archiv Lebensmittelhyg. 36, 53-55

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1987):

Ein enzymimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in Milch

Archiv Lebensmittelhyg. 38, 3-7

MÄRTLBAUER, E., M. GAREIS und G. TERPLAN (1988):

Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: production, properties, and use of rabbit antibodies

Appl. Environ. Microbiol. 54, 225-230

MANN, I. (1986):

Mycotoxins - A threat to human and animal health and the implications to developing countries

In: Proceedings of the 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, p. 1136-1139

Robert von Ostertag Institute, Berlin

MARTIN, C. N. und R. C. GARNER (1977):

Aflatoxin B₁-oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acids

Nature (London) 267, 863-865

MASRI, M. S., R. E. LUNDIN, J. R. PAGE und V. C. GARCIA (1967):

Crystalline aflatoxin M₁ from urine and milk

Nature 215, 753-755

MAYURA, K., R. V. REDDY, A. W. HAYES und O. W. BERNDT (1982):

Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats

Toxicol. 25, 175-185

MEYER, H. H. D. (1986):

Possible ways of improving enzymeimmunoassay (EIA) techniques and their application in animal production

In: Proceedings of an interational symposium on the use of nuclear techniques in studies of animal production and health in different environments, p. 255-262

International Atomic Energy Agency, Vlenna

MEYER, H. H. D. und B. GÜVEN (1986):

Improvement of microtitration plate enzyme immunoassays for steroid determination by a 'second antibody technique'.

J. Steroid. Biochem. 25, Suppl. Abstr. 139.

MEYER, H. H. D. und S. HOFFMANN (1987):

Development of a sensitive microtitration plate enzyme-immunoassay for the anabolic steroid trenbolone

Food Additives and Contaminants 4, 149-160

MORGAN, M. R. A. (1985):

Newer techniques in food analysis-immunoassays and their application to small molecules

J. Assoc. Publ. Analysts 23, 59-63

- MORGAN, M. R. A., R. MCNERNEY und H. W.-S. CHAN (1983):
Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1481-1484
- MORGAN, M. R. A., A. S. KANG und H. W.-S. CHAN (1986a):
Production of antisera against sterigmatocystin hemiacetal and its potential
for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for sterigmatocystin in
barley
J. Sci. Food Agric. 37, 873-880
- MORGAN, M. R. A., R. MCNERNEY, H. W.-S. CHAN und P. H. ANDERSON (1986b):
Ochratoxin A in pig kidney determined by enzyme-linked immunosorbent
assay (ELISA)
J. Sci. Food Agric. 37, 475-480
- MUNKSGAARD, L., J. LARSEN, H. WERNER, P. E. ANDERSEN und B. T. VIUF
(1987):
Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products
Milchwissenschaft 42, 165-167
- NESBITT, B. F., J. O'KELLY, K. SARGEANT und A. SHERIDAN (1962):
Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*
Nature 195, 1062-1063
- NEWSOME, H. W. (1986):
Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 6, 919-923
- NGO, T. T. und H. M. LENHOFF (1981):
Recent advances in homogeneous and separation-free enzyme immunoassay
Appl. Biochem. Biotech. 6, 53-64
- NIESCHLAG, E., H. K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):
Production of steroid antisera in rabbits
in: CAMERON, E. D. H., S. G. HILLIER und K. GRIFFITH: Steroid immunoassays
proceedings of the 5th Tenovus Workshop, p. 87-96
Alpha Omega Publ., Cardiff, Wales
- NOLTE, H., A. V. Z. MÜHLEN und R. D. HESCH (1976):
Auswertung radioimmunochemischer Bestimmungsmethoden durch
"Spline-Approximation"
J. Clin. Chem. Biochem. 14, 253-259

O'SULLIVAN, M. J. J. W. BRIDGES und V. MARKS (1979):

Enzyme immunoassay: a review

Annals Clin. Biochem. 16, 221-240

OELLERICH, M. (1984):

Enzym-immunoassay: a review

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 895-904

OHTANI, K., O. KAWAMURA, H. KAJII, J. CHIBA und Y. UENO (1985):

Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for T-2 toxin using monoclonal antibodies

Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 22, 31-32

PATTERSON, D. S. P. (1973):

Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species

Fd Cosmet. Toxicol. 11, 287-294

PATTERSON, D. S. P. und B. A. ROBERTS (1971):

The in vitro reduction of aflatoxin B₁ and B₂ by soluble avian liver enzymes

Fd Cosmet. Toxicol. 9, 829-

PATTERSON, D. S. P., E. M. GLANCY und B. A. ROBERTS (1980):

The 'carry over' of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁

Fd Cosmet. Toxicol. 18, 35-37

PECHT, I. und D. LANCET (1977):

Kinetics of antibody-hapten interactions

Mol. Biol. Biochem. Biophys. 24, 306-338

PEERS, F. G. (1980):

Aflatoxin in relation to the epidemiology of human liver cancer

Med. Mycol., Zbl. Bakt. Suppl. 8, 279-289

PEERS, F. G. und C. A. LINSELL (1973):

Dietary aflatoxins and liver cancer. A population based study in Kenya

Brit. J. Cancer 27, 473-484

PEERS, F. G., G. A. GILMAN und C. A. LINSELL (1976):

Dietary aflatoxins and human liver cancer. A study in Swaziland

Int. J. Cancer 17, 167-176

- PESCE, A. J., D. J. FORD und M. A. GAIZUTIS (1978):
Qualitative and quantitative aspects of immunoassay
Scand. J. Immunol. 8, Suppl. 7, 1-6
- PESTKA, J. J. und F. S. CHU (1984):
Aflatoxin B₁ dihydrodiol antibody: production and specificity
Appl. Environ. Microbiol. 47, 472-477
- PESTKA, J. J., P. K. GAUR und F. S. CHU (1980):
Quantitation of aflatoxin B₁ and aflatoxin B₁ antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay
Appl. Environ. Microbiol. 40, 1027-1031
- PESTKA, J. J., Y. LI, W. O. HARDER und F. S. CHU (1981a):
Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ in milk
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 294-301
- PESTKA, J. J., S. C. LEE, H. P. LAU und F. S. CHU (1981b):
Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin
J. Am. Oil Chem. Soc. 58, 940A-944A
- PESTKA, J. J., B. W. STEINERT und F. S. CHU (1981c):
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A
Appl. Environ. Microbiol. 41, 1472-1474
- PESTKA, J. J., M.-T. LIU, B. K. KNUDSON und M. G. HOGBERG (1985):
Immunization of swine for production of antibody against zearalenone
J. Food Protection 48, 953-957
- PETERS, H., M. P. DIERICH und K. DOSE (1982):
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1437-1441
- PINCKARD, R. N. (1979):
Equilibrium dialysis and preparation of hapten conjugates
in: WEIR, D. M.: Handbook of experimental immunology, p. 17.1-17.22
Blackwell Scientific Publ. Oxford
- POHLAND, A. E. M. E. CUSHMAC und P. J. ANDELLOS (1968):
Aflatoxin B₁ hemiacetal
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51, 907-910
- PRATT, J. J. (1978):
Steroid immunoassay in clinical chemistry
Clin. Chem. 24, 1869-1890

PRICE, R. L. J. H. PAULSON, O. G. LOUGH, C. GINGG und A. G. KURTZ (1985):
Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally-contaminated whole
cottonseed

J. Food Protection 48, 11-15

PURCHASE, I. F. H. (1967):

Acute toxicity of aflatoxin M_1 and M_2 in one-day-old ducklings
Fd Cosmet. Toxicol. 5, 339-342

QIAN, G.-S., P. YASEI und G. C. YANG (1984):

Rapid Extraction and detection of aflatoxin M_1 in cows milk by
high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay
Anal. Chem. 56, 2079-2080

QUARRIE, S. A. und G. GALTRE (1985):

Use of different hapten-protein conjugates immobilized on nitrocellulose to
screen monoclonal antibodies to abscisic acid
Anal. Biochem. 151, 389-399

RAM, B. P., L. P. HART, R. J. COLE und J. J. PESTKA (1986a):

Application of ELISA to retail survey of Aflatoxin B_1 in peanut butter
J. Food Protection 49, 792-795

RAM, B. P., L. P. HART, O. L. SHOTWELL und J. J. PESTKA (1986b):

Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B_1 in naturally
contaminated corn and cottonseed
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 904-907

RAUCH, P., L. FUKAL, J. PROSEK, P. BREZINA und J. KAS (1987):

Radioimmunoassay of aflatoxin M_1
J. Radioanal. Nucl. Chem. 117, 163-169

RAWN, J. D. (1983):

Biochemistry
Harper & Row Publ. New York

REINSCH, CH. H. (1967):

Smoothing by spline functions
Num. Math. 10, 177-183

REISS, J. (1981):

Schädigungen beim Menschen durch Mykotoxine
in: REISS, J.: Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 199-222
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

- RICE, D. W. und HSIEH D. P. H. (1982):
Aflatoxin M₁: in vitro preparation and comparative in vitro metabolism
versus aflatoxin B₁ in rat and mouse
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 35, 467-490
- ROITT, I. M. (1984):
Leitfaden der Immunologie
Steinkopf Verlag Darmstadt
- RÖSCHENTHALER R., E.-E. CREPPY, G. LORKOWSKY und G. DIRHEIMER (1981):
Ochratoxin A - Die Wirkungsweise eines Mykotoxins
Forum Mikrobiologie 5, 262-270
- ROUSSEAU, D. M., G. A. SLEGGERS, C. H. VAN PETEGHEM und A. CLAEYS
(1984):
Synthesis of ¹⁴C-ochratoxin A
J. Label. Compounds Radiopharm. 21, 429-440
- ROUSSEAU, D. M., G. A. SLEGGERS und C. H. VAN PETEGHEM (1985):
Radioimmunoassay of ochratoxin A in barley
Appl. Environ. Microbiol. 50, 529-531
- ROUSSEAU, D. M., A. A. G. CANDLISH, G. A. SLEGGERS, C. H. VAN PETEGHEM,
W. H. STIMSON und J. E. SMITH (1987):
Detection of ochratoxin A in porcine kidneys by a monoclonal antibody based
radioimmunoassay
Appl. Environ. Microbiol. 53, 514-518
- SANO, A., Y. ASABE, S. TAKITANI und Y. UENO (1982):
Fluorodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with
nicotinamide and 2-acetylpyridine on silica gel layer
J. Chromatogr. 235, 257-265
- SALHAB, A. S., F. P. ABRAMSON, G. W. GEELHOED und G. S. EDWARDS (1977):
Aflatoxicol M₁, a new metabolite of aflatoxicol
Xenobiotica 7, 401-406
- SCARISBRICK, J. J. und E. D. H. CAMERON (1975):
Radioimmunoassay of progesterone: comparison of [1,2,6,7-³H₄]-progesterone
and progesterone-[¹²⁵I]-iodohistamine radioligands
J. Steroid Biochem. 6, 51-56

SCHALL, R. F. und H. J. TENOSO (1980):
Recent developments in heterogeneous enzyme immunoassays
in: NAKAMURA, R. M., W. R. DITO und E. S. TUCKER III: Immunoassays clinical
laboratory techniques for the 1980s, p. 127-139
A. R. Liss Inc. New York

SCHWALBE-FEHL, M. (1986):
Immunoassays in environmental analytical chemistry
Intern. J. Environ. Anal. Chem. 26, 295-304

SHANK, R. C., N. BHAMARAPRAVATI, J. E. GORDON und G. N. WOGAN (1972):
Dietary aflatoxins and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver
cancer in two municipal populations in Thailand
Food Cosmet. Toxicol. 10, 171-179

SIEBER, R. und B. BLANC (1978):
Zur Ausscheidung von Aflatoxin M₁ in die Milch und dessen Vorkommen in
Milch und Milchprodukten - eine Literaturübersicht
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 69, 477-491

SINGH, P. und L. JANG (1987):
A membrane-based enzyme immunoassay test for aflatoxin B₁
Int. J. Food Microbiol. 5, 73-80

SINGH, R. und D. P. H. HSIEH (1977):
Aflatoxin biosynthetic pathway: Elucidation by using blocked mutants of
Aspergillus parasiticus
Arch. Biochem. Biophys. 178, 285-292

SIZARET, P., C. MALAVEILLE, R. MONTESANO und C. FRAYSSINET (1982):
Detection of aflatoxins and related metabolites by radioimmunoassay
J. Natl. Cancer Inst. 69, 1375-1381

SNYDER, A. P. (1986):
Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene
mycotoxins
J. Food Protection 49, 544 - 569

SOINI, E. und I. HEMMILÄ (1979):
Fluoroimmunoassay: present status and key problems
Clin. Chem. 25, 353-361

SOINI, E. und H. KOJOLA (1983):
Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates-a new generation of
nonisotopic immunoassays
Clin. Chem. 29, 65-68

STANWORTH, D. R. und M. W. TURNER (1979):

Immunochemical analysis of immunoglobulins and their sub-units
in: WEIR, D. M.: Handbook of experimental immunology, p. 6.1-6.13
Blackwell Scientific Publ. Oxford

STØREN, O., H. HOLM und F. C. STORMER (1982):

Metabolism of ochratoxin A by rats
Appl. environ. Microbiol. 44, 785-789

STØRMER, F. C., C. E. HANSEN, J. I. PEDERSEN, G. HVIISTENDAL und A. J. AASEN (1981):

Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxy-ochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species
Appl. environ. Microbiol. 42, 1051-1058

STREITWIESER, A. und C. H. HEATHCOCK (1980):

Organische Chemie
Verlag Chemie Weinheim

SUN, P. und F. S. CHU (1977):

A simple solid-phase radioimmunoassay for aflatoxin B₁
J. Food Safety 1, 67-75

SWANSON, S. P., H. D. ROOD, J. C. BEHRENS und P. E. SANDERS (1987):

Preparation and characterisation of deepoxy trichothecenes: deepoxy T-2 triol, deepoxy T-2 tetraol, deepoxy 15-monoacetoxyscirpenol, and deepoxy scirpentiol
Appl. Environ. Microbiol. 53, 2821-2826

SWENSON, D. H., J.-K. LIN, E. C. MILLER und J. A. MILLER (1977):

Aflatoxin B₁-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B₁ and B₂ to rat liver DNA and ribosomal RNA in vivo
Cancer Res. 37, 172-181

THOUVENOT, D. und R. F. MORFIN (1983):

Radioimmunoassay for zearalenone and zearalanol in human serum: production, properties, and use of porcine antibodies
Appl. Environ. Microbiol. 45, 16-23

UENO, Y. (1977a):

Mode of action of trichothecenes
Ann. Nutr. Aliment. 31, 885-900

DERSELBE (1977b):

Trichothecenes: overview adress

in: Rodricks, J. V., C. W. Hesseltine und M. A. Mehlman: Mycotoxins in human and animal health, p. 189-207

Pathotox Publishers Inc., Park Forest South, Illinois

VAN DER MERWE, K. J., P. S. STEYN, L. FOURIE, De B. SCOTT und J. J. THERON (1965):

Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature 205, 1112-1113

VAN WEEMEN, B. K. und A. H. W. M. SCHUURS (1971):

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates

FEBS Letters 15, 232-236

DIESELBEN (1975):

The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays

Immunochemistry 12, 667-670

DIESELBEN (1976):

Sensitivity and specificity of hapten enzyme-immunoassays

in: FELDMANN, G., P. DRUET, J. BIGNON und S. AVRAMEAS: Immunoenzymatic techniques, p. 125-133

North-Holland Publ. Company, Amsterdam-Oxford

VINING, R. F., P. COMPTON und R. MCGINLEY (1981):

Steroid radioimmunoassay-effect of shortened incubation time on specificity Clin. Chem. 27, 910-913

VISCONTI, A. und C. J. MIROCHA (1985):

Identification of various T-2 toxin metabolites in chicken excreta and tissues

Appl. Environ. Microbiol. 49, 1246-1250

WALLACE, E. M., S. V. PATHRE, CH. J. MIROCHA, T. S. ROBISON und S. W. FENTON (1977):

Synthesis of radiolabeled T-2 toxin

J. Agric. Food. Chem. 25, 836-838

WANG, T. V. und P. A. CERUTTI (1979):

Formation and removal of aflatoxin B₁-induced DNA lesions in epitheloid human lung cells

Cancer Res. 39, 5165-5170

WARDEN, B. A., K. ALLAM, A. SENTISSI, D. J. CECCHINI und R. W. GIESE (1987):

Repetitive hit-and-run flouoroimmunoassay for T-2 toxin
Anal. Biochem. 162, 363-369

WARNER, R. und J. J. PESTKA (1987):

ELISA survey of retail grain-based food products for zearalenone and aflatoxin B₁

J. Food Protect. 50, 502-503

WARNER, R., B. P. RAM, L. P. HART und J. J. PESTKA (1986):

Screening for Zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay

J. Agric. Food Chem. 34, 714-717

WEI, D.-L., W.-L. CHEN, R.-D. WEI und S.-C. JONG (1984):

Identity and aflatoxin producing ability of *Aspergillus* reference cultures
In: KURATA, H. und Y. UENO: Toxicogenic fungi - their toxins and health hazard, p. 87-97

Elsevier Science Publ. B. V. Amsterdam

WEI, R.-D. und F. S. CHU (1987):

Production and characterization of a generic antibody against group A trichothecenes

Anal. Biochem. 160, 399-408

WEI, R.-D., W. BISCHOFF und F. S. CHU (1986):

Production and characterization of antibody against 3'-OH-T-2 toxin

J. Food Protection 49, 267-271

WEI, R.-D., F. M. STRONG, E. B. SMALLEY und H. K. SCHNOES (1971):

Chemical interconversion of T-2 and HT-2 toxins and related compounds

Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 396-401

WINTERLIN, W., G. HALL, D. P. H. HSIEH (1979):

On-column chromatographic extraction of aflatoxin M₁ from milk and determination by reserved phase high performance liquid chromatography

Anal. Chem. 51, 1873-1874

WISDOM, G. B. (1976):

Enzyme-immunoassay

Clin. Chem. 22, 1243-1255

WOGAN, G. N. (1966):

Chemical nature and biological effects of the aflatoxins

Bact. Rev. 30, 460-470

DERSELBE (1975):

Mycotoxins

Ann. Rev. Pharmacol. 15, 437-451

DERSELBE (1977):

Mode of action of aflatoxins

in: RODRICKS, J. V., C. W. HESSELTINE und M. A. MEHLMAN: Mycotoxins in human and animal health, p. 29-36

Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois

WOGAN, G. N. und S. PAGLIALUNGA (1974):

Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats

Fd Cosmet. Toxicol. 12, 381-384

WONG, J. J. und D. P. H. HSIEH (1976):

Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2241-2244

WOOD, W. G. (1984):

Luminescence immunoassays: problems and possibilities

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 905-917

WORSAAE, H. (1978):

Production of an ochratoxin A antigen with high hapten/carrier molar ratio

Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C 86, 203-204

WOYCHIK, N. A., R. D. HINS DILL und F. S. CHU (1984):

Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M₁

Appl. Environ. Microbiol. 48, 1096-1099

XU, Y.-C., G.-S. ZHANG und F. S. CHU (1986):

Radioimmunoassay of deoxynivalenol in wheat and corn

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 967-969

YANG, G., S. NESHEIM, J. BENAVIDES, I. UENO, A. D. CAMPBELL und A. POHLAND (1980):

Radioimmunoassay detection of Aflatoxin B₁ in monkey and human urine
Zentralbl. Bakteriол. Suppl. 8, 329-335

- YOSHIZAWA, T., S. P. SWANSON und C. J. MIROCHA (1980):
T-2 metabolites in the excreta of broiler chickens administered ^3H -labeled
T-2 toxin
Appl. Environ. Microbiol. 39, 1172-1177
- YOSHIZAWA, T., T. SAKAMOTO und K. OKAMOTO (1984):
In vitro formation of 3'-hydroxy T-2 and 3'-hydroxy HT-2 toxins from T-2
toxin by liver homogenates from mice and monkeys
Appl. Environ. Microbiol. 47, 130-134
- YOSHIZAWA, T., C. J. MIROCHA, J. C. BEHRENS und S. P. SWANSON (1981):
Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow
Fd Cosmet. Toxicol. 19, 31-39
- YOSHIZAWA, T., T. SAKAMOTO, Y. AYANO und C. J. MIROCHA (1982):
3'-hydroxy T-2 and 3'-hydroxy HT-2 toxins: new metabolites of T-2 toxin,
a trichothecene mycotoxin, in animals
Agric. Biol. Chem. 46, 2613-2615
- ZHANG, G.-S., S. L. SCHUBRING und F. S. CHU (1986a):
Improved method for production of antibodies against T-2 toxin and
diacetoxyscirpenol in rabbits
Appl. Environ. Microbiol. 51, 132-137
- ZHANG, G.-S., S. W. LI und F. S. CHU (1986b):
Production and characterization of antibody against deoxynivalenol triacetate
J. Food Protection 49, 336-339

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas, seine großzügige und jederzeit gewährte Unterstützung sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Weiter möchte ich mich bei Frau Marlon Lorber, Frau Margit Straka und Frau Ute Geiger sowie allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Lebenslauf

Erwin Peter Märtlbauer

Geboren am 6. September 1957 in Ortenburg

Eltern

Elfriede Märtlbauer, geb. Schebesta
Erwin Märtlbauer

Schulbildung

Grundschule in Ortenburg von 1963 bis 1967
9 Jahre humanistisches Gymnasium
Abitur 1976 in Fürstenzell

Studium

11 Semester an der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München von 1977 bis 1982

Staatsexamen

2. Dezember 1982

Approbation

15. Februar 1983

Promotionsstudium

Seit August 1983 als wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München



